

SYNTEZA ENZYMATYCZNA MULTIBLOKOWEGO KOPOLIMERU POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU-CO-GLIKOLU ETYLENOWEGO) (PBS-EG) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZEPU CANDIDA ANTARCTICA

BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY*

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, CENTRUM DYDAKTYCZNO-BADAWCZE NANOTECHNOLOGII, AL. PIASTÓW 45, 71-311 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania nad syntezą segmentowego kopolimeru (estero-eteru) – poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG) z użyciem lipazy B, pochodzącej ze szczepu *Candida antarctica* jako katalizatora. Polimeryzację przeprowadzono w roztworach eteru difenyłowego z udziałem bursztynianu dietylu i 1,4-butanediolu oraz poli(glikolu etylenowego) (PEG), wprowadzanego na różnych etapach reakcji, w temperaturze 80°C w warunkach zmiennego ciśnienia. Oceniono wpływ ciśnienia oraz sposobu wprowadzania PEGu na budowę chemiczną i właściwości termiczne otrzymanych kopolimerów (estero-eterów). Budowa chemiczna zsyntezowanych kopolimerów została oceniona na podstawie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni (IR). Właściwości termiczne zbadano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Wykazano, że zastosowanie enzymu jako katalizatora prowadzi do otrzymania kopolimeru segmentowego, jednak reakcje przebiegają z dosyć niskimi wydajnościami oraz powstałe kopolimery wykazują małą wartość masy molowej. Stwierdzono również, że na większą wydajność reakcji oraz wzrost masy molowej wpływa jej prowadzenie w warunkach nadciśnienia niż podciśnienia.

Słowa kluczowe: kataliza enzymatyczna, lipaza, kopolimery estero-eterowe, poli(bursztynian butylenu), polikondensacja

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 42-48]

Wprowadzenie

Polimery biodegradowalne są najczęściej stosowanymi materiałami jako podłoża dla hodowli komórkowych metodami inżynierii tkankowej. Należą do nich głównie poliestry alifatyczne, takie jak poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA), poli(ε-kaprolakton) (PCL) i ich kopolimery [1]. Zazwyczaj są one syntezowane na drodze reakcji chemicznych, w których substraty (monomery) ulegają polimeryzacji w obecności różnych układów katalitycznych, głównie alkoholanów lub tlenków metali [2-5]. Niestety, wiele spośród tych układów wykazuje właściwości toksyczne [6,7], dlatego enzymy wzbudzają coraz większe zainteresowanie w ostatnich latach jako nietoksyczne i wysoce selektywne układy katalityczne.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(BUTYLENE SUCCINATE-CO-ETHYLENE GLYCOL) MULTIBLOCK COPOLYMER (PBS-EG) CATALYZED BY LIPASE B FROM CANDIDA ANTARCTICA

BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, NANOTECHNOLOGY CENTRE, AL. PIASTÓW 45, 70-311 SZCZECIN, POLAND

* E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Abstract

The paper presents studies on the synthesis of segmented copoly(ester-ether) - a poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG) using as a catalyst - lipase B derived from *Candida antarctica* strain. The polymerization was performed in the solutions of diphenyl ether, involving diethyl succinate and 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) (PEG) introduced at different stages of the reaction, at 80°C under variable pressure. The influence of variable pressure and methods of introducing PEG monomer on the chemical structure and thermal properties of resulting copoly(ester-ether) was examined. The chemical structure of synthesized copolyesters was determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) and infrared spectroscopy (IR). The thermal properties were investigated using differential scanning calorimetry (DSC). It was observed that use of enzyme as catalyst allows to obtain a segmented copolymer, however the reactions take place with relatively low yields and molar mass. It was also found that higher yield and molar mass of the reaction was observed at overpressure than at underpressure conditions.

Keywords: enzymatic polymerization, lipase, poly(ether-ester) copolymer, poly(butylene succinate), polycondensation

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 42-48]

Introduction

Biodegradable polymers are most commonly used materials as templates for cell culture tissue engineering methods. These include aliphatic polyesters, such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(ε-caprolactone) (PCL), and their copolymers [1]. They are usually synthesized by chemical processes where monomeric units are polymerized in a presence of different catalytic systems, mostly alkoxides or oxides [2-5]. Unfortunately, many of these catalysts are reported to be toxic [6,7], therefore enzymes have attracted intensive interest in the past decades as non toxic and highly selective catalytic systems. Enzymes are biocatalysts, which catalyze all metabolic reactions in vivo, including biopolymers (biomacromolecules) synthesis. In the past decades, enzymes have emerged as potent catalysts for the preparation of well-defined functional polymers. For the synthesis of biodegradable polyesters, some isolated lipases were used since they are stable in organic solvents.

Enzymy należą do grupy biokatalizatorów odpowiedzialnych za przemiany metaboliczne *in vivo*, włączając syntezę biopolimerów (biomakromolekuł). W ostatnich latach, enzymy zaczęto stosować jako katalizatory w syntezie wielofunkcyjnych polimerów o dobrze zdefiniowanej strukturze. Do syntezy biodegradowalnych poliestrów stosowane są najczęściej lipazy ze względu na ich stabilność w mediach organicznych.

Poli(bursztynian butylenu) (PBS) jest alifatycznym poliestrem o dobrej wytrzymałości mechanicznej, biokompatybilności w kontakcie z komórkami osteoblastów, indukując ich namnażanie oraz różnicowanie [8]. Testy degradacji hydrolytycznej wykazały, że PBS ulega degradacji w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami w sposób analogiczny do poli(alfa-hydroksykwasów) [9], a produkty jego degradacji, m.in. fumaran, są nietoksyczne (cząsteczki bursztynianu i fumaranu są obecne w Cyklu Krebsa), dlatego materiał ten jest obiecującym kandydatem do zastosowań medycznych [8-11], szczególnie do rekonstrukcji tkanek miękkich i twardej w inżynierii tkankowej. Proces biodegradacji poliestrów można modyfikować poprzez wprowadzanie hydrofilowych segmentów, np. polieterów do łańcucha polimerowego, ponieważ homopolimer PBS wykazuje wysoki stopień krystaliczności i jest hydrofobowy. Zastosowanie polieterów jako składników segmentów giętkich w kopolimerach PBS prowadzi do utworzenia materiałów, których właściwości mechaniczne mogą być łatwo kontrolowane poprzez rodzaj, udział wagowy i długość segmentu giętkiego. Przykładowo, poli(glikol etylenowy) (PEG), znany jako nietoksyczny, nieantygenny i biozgodny substrat jest często stosowany jako składnik poprawiający właściwości hydrofilowe i biokompatybilność biomateriałów polimerowych.

Biorąc pod uwagę zalety alifatycznego poliestru, jakim jest PBS oraz hydrofilowego polieteru, PEG, a także użycie nietoksycznych enzymów jako katalizatorów, w niniejszej pracy podjęto po raz pierwszy badania nad otrzymaniem i zbadaniem właściwości tych nowych materiałów. Jak dotąd, aktywność katalityczna lipaz została sprawdzona w syntezie wysokocząsteczkowego PBS [12-17], jednakże bezpośrednia synteza z kwasu bursztynowego i 1,4-butanediolu jest trudna z powodu rozdziału fazowego reagentów. W celu uniknięcia tego problemu, używa się estrów kwasu bursztynowego, bursztynianu dietylu i 1,4-butanediolu uzyskując homogeniczną mieszaninę reakcyjną w odpowiednim rozpuszczalniku [18,19]. Polimeryzacja katalizowana lipazami wykazuje wysoką chemo-, regio- i enancjo-selektywność, co pozwala utrzymać kontrolę nad budową chemiczną i finalnymi właściwościami PBS [18].

W pracy przedstawiono syntezę segmentowych kopolimerów (estro-eterów) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-PEG), katalizowaną lipazą B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica*. Sekwencje poli(bursztynianu butylenu) (PBS) tworzą w takich układach segmenty sztywne, natomiast poli(glikolu etylenowe) (PEG) stanowią segmenty giętkie. Zbadano wpływ ciśnienia oraz sposobu wprowadzania polieteru na wydajność prowadzonych syntez, budowę chemiczną i właściwości termiczne otrzymanych materiałów.

Materiały i metody

Materiały

Kopoli(estro-etry) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego), oznaczone w pracy jako PBS-EG, otrzymano metodą polimeryzacji enzymatycznej przy użyciu bursztynianu dietylu (BDE), 1,4-butanediolu (1,4-BD) oraz poli(glikolu etylenowego) (PEG_1000) w eterze difenylowym. Jako katalizatora użyto lipazę B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica* o nazwie handlowej Novozym 435th (N435). Schemat syntezy przedstawiono na RYS. 1.

Poly(butylene succinate) (PBS) is a typical biodegradable aliphatic polyester with excellent mechanical properties, good biocompatibility in contact with osteoblasts inducing their proliferation and differentiation [8]. The hydrolytic degradation indicated that PBS was degrading in the solution of phosphate buffered saline and showed similar behavior to poly(alpha-hydroxy acids) [9] and its degradation products, including fumarate, are non-toxic (succinate and fumarate molecules are included in the Krebs Cycle), therefore this material is of great promise for biomedical applications [8-11], especially for soft and hard tissue engineering. The biodegradability of polyesters can be improved by increasing the hydrophilicity, such as by the introduction of hydrophilic segments, i.e. polyethers, because PBS as a homopolymer is highly crystalline and hydrophobic. The introduction of polyether soft segments into copolyesters leads to the formation of segmented polymers whose mechanical properties can be easily controlled by the type, the weight percent and the length of the soft segments. For example, poly(ethylene oxide), known as nontoxic, non-antigenic and non-immunogenic polymer, is often used as the component to impart good hydrophilicity and biocompatibility of biomaterials.

Taking the advantages of aliphatic polyester such as PBS and hydrophilic PEG polyether, and enzymes as non-toxic catalysts, we report here, for the first time, our work on the synthesis and characterization of these new materials. So far, lipase catalysis was successfully employed to synthesize high molecular weight PBS [12-17], however direct synthesis of succinic acid and 1,4-butanediol remains inefficient due to the phase separation of the reagents. To overcome this problem, monophasic reaction mixtures in the corresponding solvent were prepared from diethyl succinate and 1,4-butanediol [18,19]. The lipase-catalyzed polymerizations show very high chemo-, regio-, and enantio-selectivities what allows to keep a good control over the chemical structure and final properties of PBS [18].

In this work, we will discuss the polymerization of segmented copoly(ether-ester) poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG) catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. In such systems, the sequences of poly(butylene succinate) (PBS) form hard segments and poly(ethylene glycol) (PEG) segments are soft. In this work, we will discuss the influence of variable pressure and introducing PEG at various stages of the reaction on reaction yield, chemical structure and thermal properties of the materials.

Materials and methods

Materials

Copoly(ether-ester) of poly (butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG), abbreviated in the work as PBS-EG, was prepared by enzymatic polymerization of succinic acid ester (diethyl succinate) and 1,4-butanediol (1,4-BD) and poly(ethylene glycol) (PEG_1000), in organic solvent (diphenyl ether). Lipase B derived from *Candida antarctica* strain, trade name Novozym 435th (N435), was used as a catalyst. The schematic outline of the synthesis is presented in FIG. 1.

N435 (10% wt. catalyst based on the total weight of all reagents), dried under 0.1 mmHg vacuum at 25°C for 24 h, was transferred into a 50 mL round-bottom flask containing monomers: diethyl succinate, 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) (PEG_1000) with organic solvent - diphenyl ether (200 wt% catalyst based on the total weight of all reagents). The reaction mixture was magnetically stirred and heated at 80°C. The molar ratio of the reagents 1,4-BD:PEG:DES was 0.015:0.02 mol.

Immobilizowany enzym, Novozym N435 (10% wag. katalizatora w stosunku do masy wszystkich reagentów), wysuszony pod ciśnieniem 0,1 mmHg w temperaturze 25°C przez 24 h, przeniesiono do kolby kulistej o pojemności 50 ml zawierającej monomery: bursztynian dietylu, 1,4-butanediol oraz poli(glikol etylenowy) (PEG_1000) zawieszony w rozpuszczalniku organicznym – eterze difenylowym (200% wag. rozpuszczalnika w stosunku do masy wszystkich reagentów). Stosunek molowy reagentów 1,4-BD:PEG/DES wynosił 0.015:0.02 mol.

Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 80°C, przy jednoczesnym mieszaniu. Reakcję prowadzono pod ciśnieniem atmosferycznym przez 2 h (I etap), następnie wytworzono podciśnienie 0,5 mmHg i reakcję prowadzono dalej przez 4 h (II etap). Otrzymany w ten sposób materiał oznaczono jako PBS-EG1. W przypadku pozostałych dwóch materiałów PBS-EG2 oraz PBS-EG3 zastosowano odpowiednio podciśnienie 0,5 mm Hg i nadciśnienie 2 mm Hg, a PEG_1000 wprowadzono dopiero na etapie polikondensacji (II etap). Udział segmentów sztywnych (W_h) do giętkich (W_s) na podstawie obliczeń stechiometrycznych wynosił 50/50% wag.

Produkty reakcji rozpuszczono w chloroformie w celu rozpuszczenia nieprzereagowanych monomerów oraz zanieczyszczeń i filtrowano w celu odmycia mikrosfer, na których był immobilizowany enzymatyczny katalizator. Roztwory polimerów w chloroformie wytrącano w metanolu w postaci białego, krystalicznego produktu. Zsyntezowane polimery przemyto jeszcze metanolem pięć razy i suszono w 50°C przez 16 h.

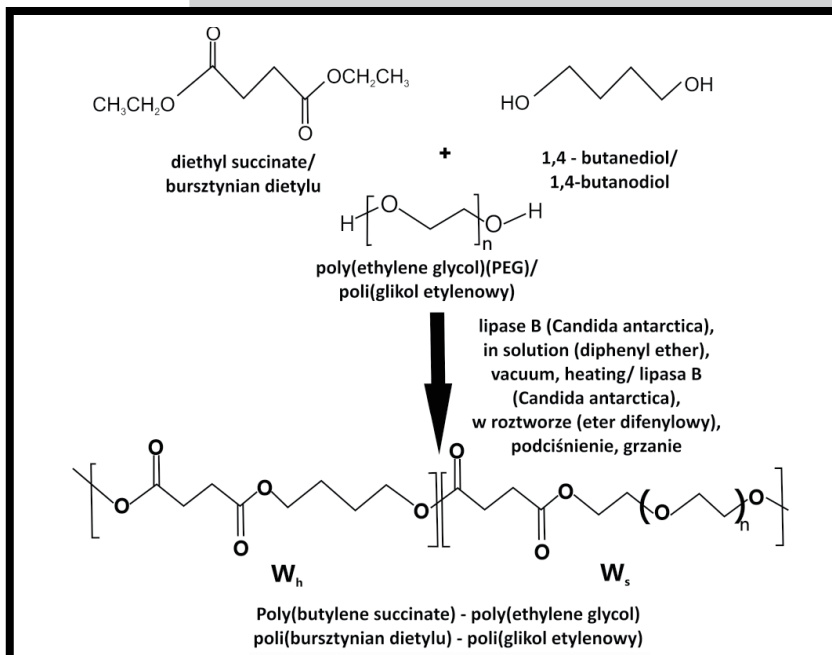
Homopolimer PBS syntezowano w analogiczny sposób, stosując warunki opisane w [20]: temperatura reakcji 80°C, ciśnienie 0,5 mmHg, czas reakcji: I etap 2 h, II etap 9 h.

Metody

Budowę chemiczną kopolimeru PBS-EG oceniono na podstawie spektrogramów magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) przy użyciu spektrometru Bruker DPX 400 w deuterowanym chloroformie. Widma zostały wykonane przy częstotliwości 400,13 MHz (^1H NMR), stosując tetrametylosilan jako wzorzec wewnętrzny. Na podstawie przykładowego widma pokazanego na RYS. 2, porównano intensywności poszczególnych pików i wyliczono zawartość segmentów giętkich w kopolimerze oraz masy molowe, korzystając z zależności jak w pracy [21], tj. porównując intensywności pików A (reszty od estru kwasu bursztynowego w PBS) i D (grupy metylenowej od PEG połączonej z grupą karboksylową od estru kwasu bursztynowego) i odczytując ilość protonów (pod powierzchnią obydwu pików) pochodzących od estru kwasu bursztynowego (1000 p^+) i od PEGu ($1743,5\text{ p}^+$).

Do oceny budowy chemicznej kopolimeru zastosowano również spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), stosując spektrofotometr Thermo Nicolet ze złotą przystawką w zakresie liczb falowych 4000 do 400 cm^{-1} .

Analizę termiczną otrzymanego kopolimeru wykonano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) przy użyciu aparatu Q100 TA Instruments w cyklu: grzanie-chłodzenie-grzanie w zakresie temperatur $-100 - 250^\circ\text{C}$, przy szybkości grzania/chłodzenia 10 deg/min .



RYS. 1. Schemat syntezy poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG).

FIG. 1. Synthesis of poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG).

The reaction was carried out under atmospheric pressure for the first 2 h (I step) and then the reaction pressure was reduced to 0.5 mmHg (underpressure), respectively, with no change in the temperature and then the reaction was carried out for 4 hours (II step). Obtained material was abbreviated as PBS-EG1. In the case of the other two materials PBS-EG2 and PBS-EG3 pressure was reduced to underpressure - 0.5 and overpressure - 2 mmHg, respectively. Besides, PEG_1000 was introduced at the polycondensation stage (second stage). The hard (W_h) to soft (W_s) segments ratio based on stoichiometric calculations was 50/50 wt%.

The resulting product mixture was dissolved in chloroform to dissolve the unreacted monomers and impurities and then the microspheres in which the enzyme catalyst was immobilized were separated. The resulting chloroform solution was slowly added with stirring to methanol to precipitate a white crystalline product. The synthesized polymer was additionally washed with methanol for five times and then dried in vacuum at 50°C for 16 h.

PBS homopolymer was synthesized in an analogous way using the conditions as described in [20]: reaction temperature 80°C, pressure 0.5 mmHg, reaction time: I stage – 2 h, II stage – 9 h.

Methods

The chemical structure of the copolymer PBS-EG was determined from magnetic nuclear resonance (^1H NMR) spectrograms. Measurements were performed with a Bruker DPX 400 apparatus in deuterated chloroform, using tetramethylsilane as an internal standard. Spectra were obtained at a frequency of 400.13 MHz. Based on ^1H NMR spectra (as shown in FIG. 2), the soft segments content and molar mass in the copolymer was calculated by comparing the intensity of the individual peaks using calculations as in work [21], i.e. by comparing the intensity of peak A (residues of succinic acid ester in PBS) and peak D (PEG methylene group linked to the carboxyl group of succinic acid ester), and reading the number of protons (the area under both peaks) derived from succinic acid ester (1000 p^+), and from PEGs (1743.5 p^+).

Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji bursztynianu dietylu, 1,4-butanodiolu oraz poli(glikolu etylenowego), prowadzonej w czasie 4 h w temperaturze 80°C i w obecności enzymu jako katalizatora, otrzymano kopolimery poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) o budowie chemicznej pokazanej na spektrogramie ^1H NMR (RYS. 2).

Szczegółowa analiza spektrogramu wykazała następujące przesunięcia chemiczne: 2,66 ($\delta\text{H}^{\text{A}}$) ppm przypisano protonom pochodzącym od jednostek kwasu bursztynowego w polimerze, natomiast sygnały przy 1,72 ($\delta\text{H}^{\text{B}}$) i 4,12 ($\delta\text{H}^{\text{C}}$) ppm odpowiadają dwóm różnym rodzajom protonów grup metylenowych pochodzących od jednostek 1,4-butanodiolu. Sygnał od protonów grup metylenowych PEG jest widoczny przy 3,64 ppm ($\delta\text{H}^{\text{D}}$). Dwa sygnały przy 3,82 ($\delta\text{H}^{\text{D}'}$) oraz 4,25 ($\delta\text{H}^{\text{D}''}$) ppm przypisano do protonów grup metylenowych pochodzących od PEG związanych z jednostkami kwasu bursztynowego.

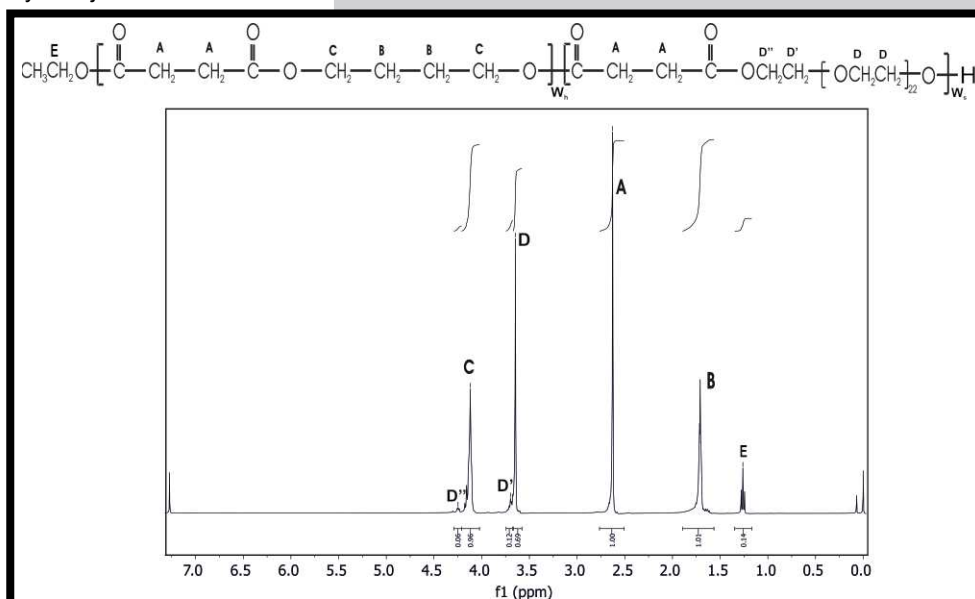
Analiza budowy chemicznej kopoliestru za pomocą ^1H NMR wykazała liniową budowę uzyskanego materiału, bez obecności struktur cyklicznych. Metoda ^1H NMR pozwoliła również na oszacowanie rzeczywistych udziałów wagowych segmentów sztywnych do giętkich, W_n/W_s (% wag.) zsyntezowanych kopolimerów. TABELA 1 zawiera obliczone wartości W_n/W_s , masy molowe (M_n) oraz wydajności reakcji (W). Wydajność reakcji obliczono jako stosunek masy produktu otrzymanego w wyniku reakcji chemicznej do masy obliczonej na podstawie współczynników stechiometrycznych równania reakcji i ilości użytych substratów.

To evaluate the chemical structure of the copolymer, fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was also carried out with Thermo Nicolet apparatus with the Golden Gate adapter in the range between 4000 and 400 cm^{-1} .

Differential scanning calorimetry (DSC) of obtained copolymer was performed with the Q100 TA Instruments apparatus is a triple cycle: heating-cooling-heating in the range from -100 - 250°C at heating/cooling rate 10 deg/min.

Results and Discussion

Enzymatic synthesis of diethyl succinate, 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) carried out for 4 hours at 80°C in the presence of an enzyme as catalyst resulted in poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) copolymers of chemical structure as depicted in the formula and shown in ^1H NMR spectrogram (FIG. 2).



RYS. 2. Widmo ^1H NMR kopolimerów PBS-EG (na przykładzie PBS-EG3 otrzymanego przy nadciśnieniu 2 mmHg).

FIG. 2. ^1H NMR spectrum of PBS-EG copolymers (example of PBS-EG3 synthesized under 2 mmHg - overpressure).

TABELA 1. Udziały wagowe (W_n/W_s), masy molowe (M_n) oraz wydajności reakcji (W) dla PBS-EG otrzymanych pod różnymi ciśnieniami i przy zmianach etapów wprowadzania segmentu giętkiego; $t = \text{const}$ (2 godz. + 4 godz.).

TABLE 1. Mass fraction (W_n/W_s), molar mass (M_n) and the yield of reaction (W) for PBS-EG obtained at different pressure and with changes in introduction of soft segment, $t = \text{const}$ (2 h + 4 h).

Material	W_n/W_s [% wag.] W_n/W_s [wt%] ^1H NMR	Masa molowa Molar mass M_n [g/mol]	Ciśnienie Pressure P [mmHg]	Wprowadzenie segmentu giętkiego (PEG) Incorporation of soft segment (PEG)	W [%]
PBS-EG1	80/20	2240	0.5	I etap / step	15
PBS-EG2	81/19	2300	0.5	II etap / step	22
PBS-EG3	70/30	2660	2.0	II etap / step	30

A detailed assignment of chemical shifts is shown as follows: the signal at 2.66 ($\delta\text{H}^{\text{A}}$) ppm was assigned to the methylene proton of SA unit in the polymer, and those at 1.72 ($\delta\text{H}^{\text{B}}$) and 4.12 ($\delta\text{H}^{\text{C}}$) ppm correspond to two different types of methylene protons of BDO unit. The peaks of methylene protons of PEG repeating unit were observed at 3.64 ppm ($\delta\text{H}^{\text{D}}$). The two small peaks at 3.82 ($\delta\text{H}^{\text{D}'}$) and 4.25 ($\delta\text{H}^{\text{D}''}$) ppm were ascribed to the two methylene protons of PEG terminus linked with SA.

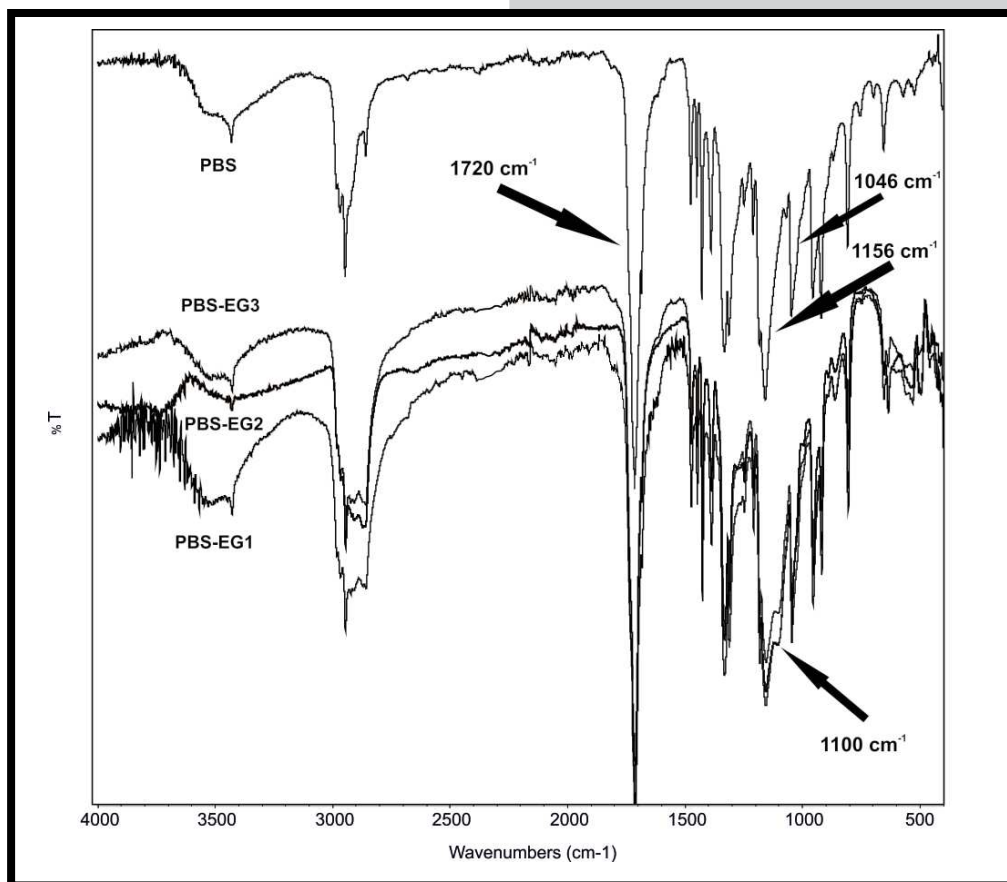
By analyzing the copolyester structure with ^1H NMR we found a linear structure without rings formation. ^1H NMR method allowed to estimate the mass fraction of hard segments to soft segments, W_n/W_s [wt%] and molar mass in the synthesized materials. TABLE 1 shows the calculated values of W_n/W_s , molar mass (M_n) and the yield (W) of the reaction. The reaction yield was calculated as the ratio of the product weight obtained during chemical reaction to the stoichiometric weight of the reagents.

Na podstawie obliczeń składu chemicznego na podstawie widm ^1H NMR stwierdzono, że w zastosowanych warunkach reakcji (całkowity czas reakcji 6 godzin i zmienne warunki ciśnienia), uzyskane produkty znacząco różnią się składem segmentowym w porównaniu do założonego na podstawie stechiometrii reakcji (50:50% wag). Najwyższą zawartość segmentów giętkich, jednak tylko 30%, wartość masy molowej (2660 g/mol) oraz wydajność reakcji na poziomie 30% uzyskano dla materiału PBS-EG3, który zsyntezowano przy ciśnieniu 2,0 mmHg. Przy znacznie obniżonym ciśnieniu, tj. 0,5 mmHg oraz podczas wprowadzenia PEG w czasie I etapu syntezy (PBS-EG1), stwierdzono niższy udział segmentów giętkich (20%), niższą masę molową (2240 g/mol) i niższą wydajność reakcji (tylko 15%). W przypadku materiału PBS-EG2 i przy zachowaniu analogicznych warunków ciśnienia jak w syntezie materiału PBS-EG1, ale przy wprowadzeniu PEG_1000 podczas drugiego etapu reakcji, obliczona wydajność reakcji wynosiła 22%, jednak zawartość segmentów giętkich wynosiła tylko 19%, a wartość masy molowej była zbliżona do tej uzyskanej dla materiału PBS-EG1. Wstępna analiza tych wyników wskazuje, że istotnym parametrem wpływającym na wydajność reakcji jest ciśnienie procesu. Jednak należy zwrócić uwagę, że reakcje prowadzono w stosunkowo krótkim czasie: 2 godz. I etap i 4 godz. II etap. Jak wynika z literatury, prowadzenie reakcji syntezy homopolimeru PBS przez 10 h prowadzi do powstania produktu o $M_n = 5500$ Da, natomiast po 72 h uzyskuje się produkt o $M_n = 10\,000$ Da [22-25]. Dlatego też kolejne syntezy należy prowadzić przy znacząco wydłużonych czasach reakcji, aby uzyskać kopolimer o wyższej masie molowej, zakładanym udziale segmentów sztywnych do giętkich, i wysokim stopniu przereagowania.

Budowę chemiczną zsyntezowanych materiałów oceniono również na podstawie widm ATR FT-IR (RYS. 3).

Based on calculations of the chemical composition of the ^1H NMR spectra it was found that the reaction conditions used (total reaction time was 6 hours and variable pressure conditions), the products obtained are significantly different in composition compared to the segment based on the assumed stoichiometry of the reaction (50:50 wt%). The highest content of soft segments, but only 30%, molar mass (2660 g/mol) and the reaction yield of 30% were obtained for PBS-EG3 material, which was synthesized at pressure 2.0 mmHg. At much lower pressure, i.e. 0.5 mmHg, and when PEG segments were introduced during the first step of the synthesis (PBS-EG1), lower content of soft segments (20%), molar mass (2240 g/mol) and lower yield of the reaction (only 15%) was found. In the case of PBS-EG2 material when maintaining similar pressure conditions as in the synthesis of PBS-EG1, but with the introduction of PEG_1000 during the second step of reaction, the calculated reaction yield was found to be 22%, but the content of soft segments was only 19% and molar mass was similar to PBS-EG1 material. Preliminary analysis of these results indicates that an important parameter affecting the yield of the reaction is applied pressure. However, it should be noted that the reactions were carried out in a relatively short period of time: 2 h (I step) and 4 h (II step). According to the literature, the first 10 h of the reaction are necessary for rapid increase in M_n up to 5500 Da. Thereafter, M_n can increase to 8000 and 10 000 by 24 and 72 h, respectively [22-25]. Therefore, next synthesis will be carried out at significantly prolonged reaction time to obtain copolymers with higher molar mass, hard to soft segments content close to stoichiometry and with high conversion.

The chemical structure of synthesized materials was also confirmed with the infrared spectroscopy (ATR-FTIR) (FIG. 3).



RYS. 3. Widma ATR FT-IR dla uzyskanych materiałów PBS-EG.
FIG. 3. ATR FT-IR spectra for obtained materials of PBS-EG.

Charakterystyczne pasma absorpcji dla widma homopolimeru PBS zaobserwowano przy długości fali 1720 cm^{-1} , 1156 cm^{-1} oraz 1046 cm^{-1} (drżania rozciągające od alifatycznych wiązań C=O). W widmach kopolimerów pojawiają się pasma charakterystyczne dla grup eterowych, w tym pochodzące od wiązań C-O-C przy długości fali 1100 cm^{-1} .

Właściwości termiczne materiałów oznaczono na podstawie termogramów DSC, a uzyskane wartości temperatur topnienia T_m , temperatur krystalizacji T_c oraz odpowiadające im entalpie zestawiono w TABELI 2. W tabeli przedstawiono również właściwości termiczne homopolimeru PBS zsyntezowanego przy zastosowaniu katalizatora enzymatycznego (PBS enz.).

Materiały PBS-EG wykazują niskotemperaturową przemianę zeszklenia, T_g (ok. -50°C) oraz temperaturę topnienia, T_m (ok. $94\text{--}98^\circ\text{C}$), co świadczy o utworzeniu się kopolimeru, gdyż niskotemperaturowe zeszklenie można przypisać segmentom giętkim PEG, natomiast T_m dotyczy segmentów sztywnych PBS (niskotemperaturowego T_g nie zaobserwowano dla homopolimeru PBS enz.). Otrzymane wartości T_m dla kopolimerów są niższe niż T_m dla PBS enz., niższe są również wartości temperatur krystalizacji, T_c , gdyż wprowadzenie oligoeteru zaburza strukturę krystaliczną poli(bursztynianu butylenu). Dla kopolimeru PBS-EG3 stwierdzono najniższą wartość zmiany ciepła właściwego oraz najniższą wartość entalpii topnienia, ΔH_m i entalpii krystalizacji, ΔH_c , co może świadczyć o dobrej mikro-separacji fazowej tego materiału (dokładna weryfikacja tego twierdzenia wymagałaby dodatkowych badań metodą WAXS).

TABELA 2. Charakterystyka właściwości termicznych dla uzyskanych materiałów PBS-EG.
TABLE 2. Characteristic thermal behavior for synthesized PBS-EG materials.

Numer próbki Sample code	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔH_m [J/g]	T_c [$^\circ\text{C}$]	ΔH_c [J/g]	T_g [$^\circ\text{C}$]	ΔC_p [J/(g $^\circ\text{C}$)]
PBS-EG1	94.8	96.4	52.5	80.9	-51.3	0.374
PBS-EG2	97.5	83.9	56.2	69.3	-48.7	0.363
PBS-EG3	98.6	37.9	50.7	28.3	-48.8	0.309
PBS enz.	108.8	123.0	71.2	93.0	-	-

where:

T_m - temperatura topnienia / melting temperature (drugi cykl ogrzewania / 2nd heating run),
 ΔH_m - entalpia topnienia / melting enthalpy,
 T_c - temperatura krystalizacji / crystallization temperature,
 ΔH_c - entalpia krystalizacji / crystallization enthalpy,
 ΔC_p - zmiana ciepła właściwego / change in heat capacity

We can see the characteristic absorption bands of PBS appeared at 1720 cm^{-1} (stretching vibration of aliphatic C\O bond), 1156 cm^{-1} , and 1046 cm^{-1} (stretching vibration of aliphatic C\O bond). In the following spectra for PBS-EG the characteristic absorption bands of PBS were noticed, at same time, the aliphatic C\O\C stretching vibration peak of PEG that appeared at 1100 cm^{-1} was found.

The characteristic thermal properties were determined from DSC scans, and high temperature melting peak, T_m and the crystallization temperature, T_c , and the corresponding enthalpies are summarized in TABLE 2. The table shows also thermal properties for the homopolymer PBS synthesized using an enzyme catalyst (PBS enz.).

PBS-EG materials exhibit low-temperature glass transition, T_g (ca. -50°C) and the melting temperature T_m (approximately $94\text{--}98^\circ\text{C}$), which indicates formation of copolymer, because low-temperature glass transition can be attributed to the soft segments (PEG), and T_m to the hard segments PBS (low temperature T_g was not observed for the homopolymer PBS enz.). T_m values obtained for the copolymers are lower than the T_m for the PBS enz., and also we can see lower crystallization temperatures, T_c . For the PBS-EG3 copolymer, the lowest value of heat capacity changes and the lowest value of the melting enthalpy, ΔH_m and crystallization enthalpy, ΔH_c , were found what may indicate good microphase separation of the material (verification of this statement would require additional measurements with WAXS).

Wnioski

Stosując immobilizowany enzym jako katalizator otrzymano kopolimery poli(estro-etry) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG) w warunkach różnych ciśnień oraz wprowadzając PEG na różnych etapach syntezy. Analiza budowy chemicznej metodami $^1\text{H NMR}$ i ATR FT-IR potwierdziła obecność ugrupowań charakterystycznych dla grup estrowych i eterowych pochodzących od sekwencji PBS i PEG. Wykazano, że zastosowane wartości ciśnienia lub nadciśnienia na etapie polikondensacji wpływają na wydajność reakcji, która wynosiła najwyżej 30%. Warunki te miały również wpływ na stopień wbudowania się oligoeterowych segmentów giętkich w strukturę makrocząsteczki, który wynosił maksymalnie 30% (w odniesieniu do wyliczonych na podstawie stechiometrii 50% wag.) oraz wartości masy molowej, wynoszącej maksymalnie 2660 g/mol . Analiza właściwości termicznych wykazała przesunięcie temperatury krystalizacji, T_c i temperatury topnienia, T_m w kierunku niższych wartości w porównaniu do homopolimeru PBS, świadcząc o utworzeniu się segmentowego kopolimeru i zaburzeniu struktury krystalicznej poli(bursztynianu butylenu).

Conclusions

We have synthesized copoly(ether-ester), namely poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG), using immobilized enzyme as a catalyst and different pressure, and introducing PEG at various steps of the reaction. Analysis of chemical structure with $^1\text{H NMR}$ and ATR FT-IR confirmed the presence of specific bonds and groups, characteristic for ester and ether groups, derived from the sequences of PBS and PEG. It has been shown, that the applied underpressure or overpressure at the polycondensation step, influence the reaction yield, which is no higher than 30%. These conditions also affected the degree of incorporation of the oligoethers soft segments to macromolecule structure, which was maximum 30% (compare to 50 wt.% calculated from the stoichiometry) and molar mass, which the highest value was 2660 g/mol . Analysis of characteristic thermal properties showed that thermal shifts of crystallization temperature, T_c , and the melting temperature T_m had lower values as compared to the homopolymer PBS, providing the formation of segmented structure of the copolymer and disorder of the crystal structure of poly(butylene succinate).

Praca finansowana w ramach projektu badawczego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich 517-10-012-4052/17.

This work was supported by the research project "Young scientists and graduate students 517-10-012-4052/17".

Piśmiennictwo

- [1] Taylor M.S., Daniels A.U., Andriano K.P., Heller J.: Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials* 5, 2 (1994) 151-157.
- [2] Oviatt T.M., Coates G.W.: Stereochemistry of Lactide Polymerization with Chiral Catalysts: New Opportunities for Stereocontrol Using Polymer Exchange Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7 (2002) 1316-1326.
- [3] Davis R.J., Liu Z.: Titania-silica: a model binary oxide catalyst system. *Chem. Mater.* 9, 11 (1997) 2311-2324.
- [4] Kim Y., Verkade J.G.: Living Polymerization of Lactide Using Titanium Alkoxide Catalysts, *Macromolecular Symposia Special Issue: Bio-Based Polymers: Recent Progress* 224, 1 (2005) 105-118.
- [5] Jacquel N., Freyermouth F., Fenouillot F., Rousseau A., Pascault J.P., Fuertes P., Saint-Loup R.: Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49, 24 (2011) 5301-5312.
- [6] Stohs S.J., Bagchi D.: Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine* 18, 2 (1995) 321-336.
- [7] Anderson J.M.: Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 31 (2001) 81-110.
- [8] Li H., Chang J., Cao A., Wang J.: In vitro Evaluation of Biodegradable Poly(butylene succinate) as a Novel Biomaterial, *Macromolecular Bioscience* 5, 5 (2005) 433-440.
- [9] Xu J., Guo B.-H.: Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate) and Applications. *Microbiology Monographs* 14 (2010) 347-388.
- [10] Wang H., Ji J., Zhang W., Zhang Y., Jiang J., Wu Z., Pu S.: Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly(butylene succinate). *Acta Biomaterialia* 5, 1 (2009) 279-287.
- [11] Xu J., Guo H.-B.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1149-1163.
- [12] Kobayashi S., Makino A.: Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry. *Chem. Rev.* 109 (2009) 5288-5353.
- [13] Mahapatro A., Kalra B., Kumar A., Gross R. A.: Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure, *Biomacromolecules* 4 (2003) 544-551.

References

- [14] Akkara J.A., Ayyagari M.S.R., Bruno F.F.: Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents, *TIBTECH FEBRUARY*, 17 (1999).
- [15] Uyama H., Kobayashi S.: Enzymatic Synthesis of Polyesters via Polycondensation. *Advances in Polymer Science* 194 (2006) 133-158.
- [16] Puskas J.E., Sen M.Y., Seo K.S.: Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, *Enzymes. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 2959-2976.
- [17] Kobayashi S.: Lipase-catalyzed polyester synthesis - A green polymer chemistry. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 86 (2010)
- [18] Linko Y.-Y., Wang Z., Seppälä J.: Lipase-Catalyzed Synthesis of Poly(1,4-Butanediol Succinate) in Organic Solvent, *Biocatalysis* 8, 4 (1994) 269-282.
- [19] Binns F., Harffey P., Roberts S.M., Taylor A.: Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 36, 12 (1998) 2069-2079.
- [20] El Fray M., Gradzik B.: Synteza enzymatyczna poli(bursztynianu butylenu) (PBS) katalizowana Lipazą B ze szczepu *Candida antarctica*: nowy obiecujący materiał dla zastosowań biomedycznych. *Inżynieria Biomateriałów* 115 (2012) 26-31/
- [21] El Fray M., Skrobot J., Bolikal D., Kohn J.: Synthesis and characterization of telechelic macromers containing fatty acid derivatives. *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 781-790.
- [22] Azim H., Dekhterman A., Jiang Z., Gross R. A.: *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Synthesis of Poly(butylene succinate): Shorter Chain Building Blocks Also Work. *Biomacromolecules* 7 (2006) 3093-3097.
- [23] Sugihara S., Toshima K., Matsumura S.: New Strategy for Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) via Cyclic Oligomers. *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 203-207.
- [24] Mahapatro A., Kalra B., Kumar A., Gross A.: Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure. *Biomacromolecules* 4 (2003) 544-551.
- [25] Xu J., Guo B.-H.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal* 5, 11 (2010) 1149-1163.