

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2019.0340

王玲玲, 刘亚敏, 谢小保, 等. 2019. 微生物胞外聚合物 γ -聚谷氨酸分子微观构型变化中的离子特异性效应[J]. 环境科学学报, 39(12): 3941-3949

Wang L L, Liu Y M, Xie X B, et al. 2019. Specific ion effects in the conformational changes of microbial extracellular polymer poly- γ -glutamic acid [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 39(12): 3941-3949

微生物胞外聚合物 γ -聚谷氨酸分子微观构型变化中的离子特异性效应

王玲玲, 刘亚敏, 谢小保, 施庆珊*

广东省微生物研究所, 广东省科学院, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

摘要: 微生物胞外聚合物对金属离子的络合影响其形态、流动性、生物利用度和生物修复的效率, 在生物处理和生物修复中起到关键作用。本文研究了一种常见土壤微生物地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)生产的胞外聚合物 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)与钙、镁、铅离子结合前后的分子构型变化。结果表明, pH 对 γ -PGA 的二级结构具有显著影响, 而离子强度($0\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 γ -PGA 的二级结构影响不大。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的加入对 γ -PGA 二级结构并无影响, 而 Pb^{2+} 的加入则对 γ -PGA 二级结构产生了显著影响。酸性条件下, γ -PGA 结构通过两种分子内氢键稳定, 形成稳定的 α -螺旋结构, 随着 pH 上升, 侧链和骨架之间的氢键被破坏, 加上不断增加的静电排斥力, 使其 α -螺旋结构向更加无规的 β -折叠和无规线团结构转变。 Pb^{2+} 的加入不仅会破坏侧链和骨架之间的氢键, 还可能破坏骨架中 CO 和 NH 之间的氢键。而 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 虽然能够与 γ -PGA 络合, 却无法改变 γ -PGA 的二级结构。

关键词: 微生物胞外聚合物; γ -聚谷氨酸; 分子微观构型; 离子特异性

文章编号: 0253-2468(2019)12-3941-09

中图分类号: X17

文献标识码: A

Specific ion effects in the conformational changes of microbial extracellular polymer poly- γ -glutamic acid

WANG Lingling, LIU Yamin, XIE Xiaobao, SHI Qingshan*

Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070

Abstract: The complexation of metal ions by microbial extracellular polymers affects their morphology, fluidity and bioavailability, and thus plays a key role in bioremediation of heavy metal contaminated soil. In this study, the conformation changes of the poly- γ -glutamic acid (γ -PGA), an extracellular polymer produced by a common soil bacterium *Bacillus licheniformis*, when bounded with calcium, magnesium and lead ions were studied. The results show that pH had a significant effect on the secondary structure of γ -PGA, while ionic strength ($0\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) had little effect on that. At a low pH, the γ -PGA structure was stabilized by two intramolecular hydrogen bonds, forming a stable α -helical structure. As the pH increased, the hydrogen bond between the CO and the NH in the backbone was destroyed. The destroyed hydrogen bond and the increased electrostatic repulsion converted the α -helix structure to a more random β -sheet and random coil structure. Ca^{2+} and Mg^{2+} had no effect, while Pb^{2+} can influence on the secondary structure of γ -PGA. Dosing Pb^{2+} not only destroyed the hydrogen bond between the side chain and the backbone of γ -PGA, but also destroyed the hydrogen bond between —CO— and —NH— in its backbone. Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ions all could complex with γ -PGA, however, they did not change the secondary structure of γ -PGA.

Keywords: microbial extracellular polymers; poly- γ -glutamic acid; conformation; specific ion effects

1 引言(Introduction)

微生物胞外聚合物作为金属离子的“载体”

(Bhatnagar *et al.*, 2017), 在生物处理和生物修复中起到关键作用(Seviour *et al.*, 2019), 它对金属离子的络合影响其形态、流动性、生物利用度和生物修

收稿日期: 2019-06-25

修回日期: 2019-08-23

录用日期: 2019-08-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 21607031); 广东省自然科学基金项目(No. 2018A030313656)

作者简介: 王玲玲(1982—), 女, E-mail: wangll@gdim.cn; * 责任作者, E-mail: shiqingshan@hotmail.com

复的效率 (Tourney *et al.*, 2014; Decho *et al.*, 2017). 尤其是对于不会发生微生物或化学降解的重金属离子, 微生物胞外聚合物的存在对于重金属离子的迁移、转化和归宿具有重要影响. 由于微生物胞外聚合物广泛分布于水体系和土壤中, 因而了解它对重金属迁移的影响可以帮助评估重金属的生态风险, 并且有助于微生物胞外聚合物对污染土壤和水体系的生物处理和生物修复的应用.

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是一种常见的土壤微生物, 可生产 γ -谷氨酸 (γ -PGA) 胞外聚合物. 该胞外聚合物也可由其他芽孢杆菌属细菌产生, 如枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、莫氏芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌等 (Bajaj *et al.*, 2011; Ogunleye *et al.*, 2015; Sirisansaneeyakul *et al.*, 2017). γ -PGA分子的侧链中含有羧基, 可与阳离子结合. γ -PGA因其在水处理中去除重金属的潜在应用而具有特殊的研究意义 (Xu *et al.*, 2015; Sakamoto *et al.*, 2016).

γ -PGA与金属离子的结合性能最早由 Mclean 等 (1990a; 1992b) 研究, 研究结果发现 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} 和 Fe^{3+} 有促进 γ -PGA 絮凝的作用, 而 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 却不能, 认为不同金属离子与 γ -PGA 的结合性能受到 γ -PGA 自身及离子的物化性质影响. Yao 等 (2007) 发现在 pH 为 3~6 时, γ -PGA 吸附重金属 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 的量随着 pH 的增加而增大, 且吸附量 $Q(\text{Cr}^{3+}) > Q(\text{Cu}^{2+}) > Q(\text{Ni}^{2+})$. He 等 (2000) 利用衰减全反射-傅里叶变换红外光谱 (ATR-FTIR) 研究了 γ -PGA 与 U(VI) 的相互作用, 认为在不同条件下聚合物构型的变化可能影响暴露的表面官能团的数量和性质, 而表面官能团是结合金属的位点, 从而导致 γ -PGA 与 U(VI) 在不同条件下结合性能的差异. γ -PGA 自身的构型主要有 α -螺旋结构、 β -折叠和无规线团 3 种 (He *et al.*, 2000). 然而这种由于阳离子自身的物化性质 (离子特异性) 和 γ -PGA 自身分子构型变化对 γ -PGA 吸附金属离子产生的影响, 却未在 γ -PGA 与金属离子之间的相互作用研究中被深入解析.

因为 Pb^{2+} 是一种重要的有害重金属并且能够有效地对 γ -PGA 絮凝, 而常见的二价金属阳离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 γ -PGA 无絮凝作用. 因此, 本研究的目的是利用圆二色谱 (CD) 获得 γ -PGA 结合重金属离子 Pb^{2+} 前后的二级结构变化, 并与常见二价金属离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 比较, 同时结合 Zeta 电势、吸附量、红

外光谱等技术, 深入解析 γ -PGA 与金属离子相互作用时的离子特异性机理, 以为微生物胞外聚合物对金属离子的迁移、转化和归宿产生的重要影响提供参考.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 γ -PGA 的纯化

本实验所用的 γ -PGA 购买自广东迪美生物技术有限公司, 为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) ATCC 9945A 发酵生产. 将所购的 γ -PGA (5% w/w) 溶液用载有分子截留量为 10 kDa 聚醚砜超滤膜的装置 (Millipore 公司, 美国) 浓缩, 再加入 5~6 倍体积的去离子水稀释, 反复浓缩和稀释至少 10 次, 以去除离子和小分子物质. 随后对获得的 γ -PGA 浓缩液用 0.22 μm 亲水性 PTFE 过滤膜过滤并冻干. 获得的 γ -PGA 固体保存在干燥器中.

2.2 γ -PGA 的表征

γ -PGA 样品水解后, 通过薄层色谱分析法 (TLC) 确认水解液中只含有谷氨酸, 同时利用比色法测定水解液中的谷氨酸含量 (Wang *et al.*, 2017). γ -PGA 水解液中的金属含量使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS, 7700X, Agilent Inc., 美国) 分析. γ -PGA 的分子量使用配有 Waters Ultrahydrogel™ Linear 柱和示差折光检测器的凝胶渗透色谱 (LC-20A, Shimadzu, 日本) 测定. 凝胶渗透色谱实验条件为: 流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0), 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样体积为 10.0 μL , 运行时间为 30 min. 使用单分散的一系列 PEO 标准品 (American Polymer Standards Co., M_p 范围为 83600~1001000) 进行分子量标定.

2.3 圆二色谱 (CD) 测试

CD 实验采用 Chirascan 光谱仪 (Applied Photophysics Co., 英国), 使用 1 cm 石英比色皿, 采集波长为 190~260 nm. γ -PGA 溶液的浓度为 10 mg·L⁻¹, 使用微量 HCl 和 NaOH 调节 pH. 由于 NaCl 会对 CD 信号产生影响, 故使用 NaF 调节溶液离子强度. CD 光谱利用软件 CDNN 2.1 (Gerald Böhm, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 德国) 进行分析, 以获得 γ -PGA 二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规线团的含量.

2.4 伏安极谱滴定

伏安极谱法可有效地区分溶液中游离和结合金属离子的含量 (d'Abzac *et al.*, 2010; Yin *et al.*,

2013). 溶液状态下的 γ -PGA/ Pb^{2+} 结合量使用 797VA Computrace (Metrohm, 瑞士) 极谱法测量, 工作电极为静态滴汞电极, 参比电极为 Ag/AgCl , 对电极为 Pt , 仪器参数列于表 1.

表 1 伏安极谱法参数

Table 1 Voltammetric parameters used for polarographic measurements

参数	设置
模式	差分脉冲
工作电极	静态滴汞电极
扫描速度	$8 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$
电压阶跃	4 mV
电压阶跃时间	0.5 s
脉冲幅度	10 mV
脉冲时间	40 ms
扫描电压范围	-0.6 ~ -0.2 V

用于伏安极谱法测定的溶液含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 支持电解质. 溶液的初始体积为 20 mL, 搅拌溶液并通过加入微量的 NaOH 或 HNO_3 溶液调节至所需的 pH, 测量温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$. 在通氮气 5 min 后对初始 γ -PGA 溶液进行空白扫描, 之后每次滴加 25 或 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $7.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 并调节 pH, 通氮气 5 min 后测量. γ -PGA/ Pb^{2+} 结合量可通过滴定曲线获得.

2.5 Zeta 电势测定

Zeta 电势采用美国 Nano Brook Omni 多角度粒度及高灵敏度 Zeta 电位分析仪分析. 为了获得足够的信号, Zeta 电势测定时 γ -PGA 的浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 离子强度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl , 氯化钙或氯化镁的浓度与 γ -PGA 谷氨酸结构单元的比例为 1:2 (由于 γ -PGA 与金属离子的作用基团为侧链上的羧基, 所以将 γ -PGA 的量归一化为 γ -PGA 谷氨酸结构单元的量, 一个谷氨酸结构单元含一个羧基). pH 用 HCl 和 NaOH 调节, 溶液测试前使用 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 亲水性 PTFE 针式过滤器过滤. 样品测定温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 每个样品平行检测 3 次, 每次扫描至少 10 次, 测定结果使用 Zeta 电势质量报告进行评估, 确保正确性.

2.6 傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析

γ -PGA、 γ -PGA/ CaCl_2 和 γ -PGA/ MgCl_2 为溶液状态, 故采用衰减全反射 (ATR) FTIR 进行分析. 为了在红外光谱中获得足够的信号, γ -PGA 的浓度为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸结构单元, CaCl_2 或 MgCl_2 的浓度为 20、40 和 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 溶液 pH 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节至 6.5, 检测器为 RT-DLaTG (Bruker 公司, 德

国), 光谱仪为 Tensor II FTIR (Bruker 公司, 德国), 使用水平衰减全反射 (ATR) 附件 (PIKE Technologies, 德国) 测量 1 mL 液体样品, 采集波数范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 以 4 cm^{-1} 分辨率进行 16 次扫描. 通过从样品光谱中减去去离子水的光谱获得最终的 ATR-FTIR 光谱.

在 pH 5.0 的 γ -PGA 溶液 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸结构单元) 中加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PbCl_2 后迅速出现沉淀, 将沉淀物用 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 的滤膜过滤并用去离子水洗涤以去除残留的离子, 冻干后直接与 FTIR 级 KBr 粉末混合进行测试. 为了比较, 使用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 调节 γ -PGA 溶液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸结构单元) 至 pH 3.0、5.0 和 7.0, 冻干并进行 FTIR 测试. 所有样品均在 Tensor II FTIR 仪器 (Bruker 公司, 德国) 上测试.

3 结果和讨论 (Results and discussion)

3.1 γ -PGA 表征

通过 TLC 分析确认 γ -PGA 水解液中只含有谷氨酸, 比色法测得谷氨酸含量为 $(7.00 \pm 0.21) \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. γ -PGA 中的主要金属离子为 Na , 含量为 $(24.41 \pm 0.27) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 占 2.44%. 另外含有微量 Mg 和 K , 其含量分别为 $(0.23 \pm 0.001) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $(0.78 \pm 0.02) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. 其余金属离子, 包括 Pb 、 Cu 、 Ni 、 Cd 、 Cr 、 Al 、 Zn 和 Ba , 在 γ -PGA 中未被检测出或可忽略不计 ($< 0.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). 基于谷氨酸和金属离子含量结果, γ -PGA 样品主要以 γ -PGA 酸 (γ -PGA-H, $5.94 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 形式存在, 一小部分 γ -PGA 以钠盐 (γ -PGA-Na, $1.06 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 形式存在. γ -PGA 的纯度测定为 93%, 分子量 (M_w) 为 $2.59 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

3.2 pH 和离子强度对 γ -PGA 二级结构的影响

图 1 显示的是不同 pH ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF) 和不同离子强度 (pH 5.0) 条件下典型的 CD 谱图. 而利用 CD 光谱软件 CDNN 2.1 获得的 γ -PGA 二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规线团的含量则如图 2 所示. γ -PGA 的 pK_a 为 4.86 (Wang *et al.*, 2017), 图 2a 中的插图说明了 pH 对 γ -PGA 中 γ -PGA-H 组分含量的影响, 即 pH 为 3.0 时, γ -PGA 主要以 γ -PGA-H 形式存在, 当 pH 从 3.0 增加到 7.0 时, γ -PGA-H 电离形成阴离子 γ -PGA⁻ 形式. 随着 pH 从 3.0 上升到 6.7, γ -PGA 二级结构中的 α -螺旋含量下降, 且其下降趋势与 γ -PGA-H 含量随 pH 上升而下降的趋势一致. 同时, γ -PGA 二级结构中的 β -转角含量略微下

降, β -折叠和无规线团结构含量上升.与 pH 相比,离子强度在 0~50 mmol·L⁻¹ 的范围内对 γ -PGA 的二级

结构影响不大.

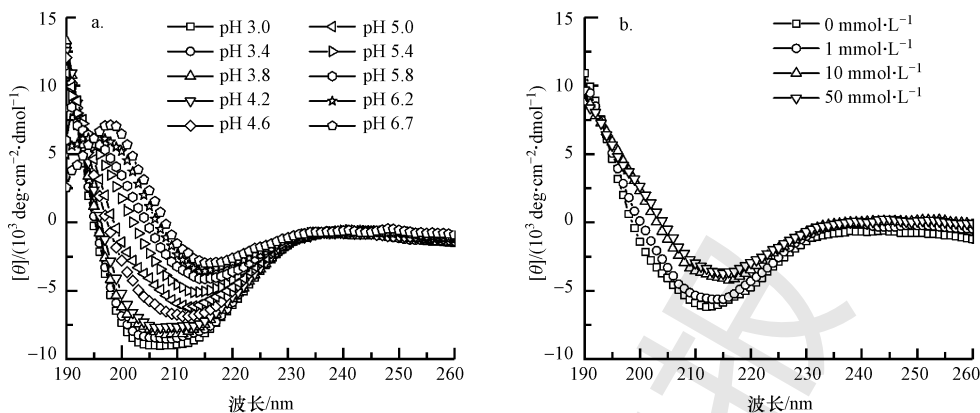


图1 不同 pH 时 10 mg·L⁻¹ γ -PGA (0 mmol·L⁻¹ NaF) 的 CD 光谱(a) 和 pH 为 5.0 时不同离子强度 (0、1、10、50 mmol·L⁻¹ NaF) 下 10 mg·L⁻¹ γ -PGA 的 CD 光谱(b)

Fig.1 Typical CD spectroscopy of 10 mg·L⁻¹ γ -PGA at different pH values (0 mmol·L⁻¹ NaF) (a) and typical CD spectroscopy of 10 mg·L⁻¹ γ -PGA at different ionic strength values (pH 5.0) (b)

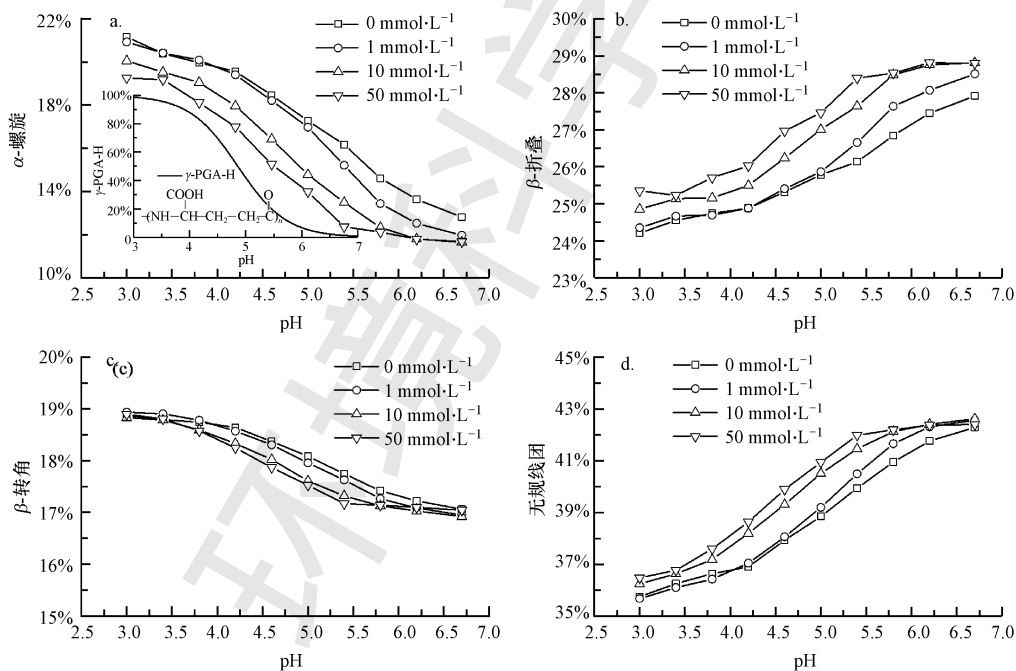


图2 pH 和离子强度 (0、1、10、50 mmol·L⁻¹ NaF) 对 10 mg·L⁻¹ γ -PGA 的 α -螺旋(a)、 β -折叠(b)、 β -转角(c) 和无规线团(d) 结构的影响 ((a) 中的插图为 γ -PGA 中 γ -PGA-H 组分含量随 pH 的变化)

Fig.2 Effects of pH and ionic strength (0, 1, 10, 50 mmol·L⁻¹ NaF) on the α -helix (a), β -sheet (b), β -turn (c) and random coil (d) structures of 10 mg·L⁻¹ γ -PGA (the inset in (a) represents the effect of pH on the γ -PGA-H fraction)

γ -PGA 的二级结构受分子内作用力的影响 (Wang *et al.*, 2017). 在酸性条件下, γ -PGA 结构通过分子内氢键稳定. 分子内氢键有两种, 一种在 γ -PGA 分子骨架中的 CO 和 NH 之间, 另一种在侧链

羧基氧和骨架 NH 之间 (Zanuy *et al.*, 1998). 理论模型表明, 在酰胺基团第 i 个 CO 和酰胺基团第 $i+3$ 个 NH 之间形成的 19 元环氢键是最稳定的构象. 而侧链羧基氧和骨架 NH 之间形成的氢键是左旋螺旋相

对高稳定性的原因(Zanuy *et al.*, 1998).

γ -PGA分子在较高 pH 条件下采用的结构可归因于两个因素.首先, γ -PGA分子侧链上的羧基由于去质子化不能保持侧链和骨架之间的氢键.其次,随着 pH 上升,不断增加的带负电的羧基基团具有更强的静电排斥力,使其向更加无规的结构转变.原子力显微镜(AFM)图像显示,由于分子内氢键断裂和静电斥力增加,酸性条件下的 γ -PGA-H由棒状变为碱性条件下球状的 γ -PGA-Na(Wang *et al.*, 2017).其他研究者也观察到类似的结果:Agresti等(2008)观察到溶液 pH 从 7.2 降低到 3.0 时, γ -PGA的构型从无规线团变为 α -螺旋;地衣芽孢杆菌的 γ -PGA在低 pH 下呈现螺旋构型并在较高 pH 下 β -折叠的构型占主导(He *et al.*, 2000).与 pH 对 γ -PGA构型的显著影响不同,在 0、1、10、50 mmol·L⁻¹ NaF 条件下,离子强度对 γ -PGA构型几乎没有影响.这可能是由于强的分子内氢键阻碍了钠离子取代 γ -PGA侧链羧基上的氢离子.

3.3 Ca²⁺、Mg²⁺和 Pb²⁺对 γ -PGA二级结构的影响

图 3 为相同浓度的 Ca²⁺、Mg²⁺和 Pb²⁺在不同 pH

条件下对 γ -PGA二级结构的影响,Ca²⁺、Mg²⁺和 Pb²⁺浓度与 γ -PGA谷氨酸结构单元的比例均为 1:2.如图所示,Ca²⁺和 Mg²⁺的加入对 γ -PGA二级结构并无影响,而 Pb²⁺的加入则对 γ -PGA二级结构产生了显著影响.在未加入二价离子时,pH 为 3.0 时 γ -PGA的二级结构由 20.1% α -螺旋、24.9% β -折叠、18.8% β -转角和 36.3%无规线团组成.随着 pH 增加至 6.7, α -螺旋从 20.1%减少到 11.7%, β -折叠和无规线团分别从 24.9%和 36.3%增加到 28.8%和 42.6%, β -转角的含量从 18.8%略微下降到 16.9%.加入 Pb²⁺后,pH 为 3.0 时 γ -PGA的二级结构由 17.0% α -螺旋、26.5% β -折叠、18.6% β -转角和 37.9%无规线团组成.随着 pH 增加至 6.7, α -螺旋的含量减少至 5.2%, β -折叠和无规线团的含量分别增加至 35.2%和 44.0%, β -转角的含量从 18.8%略微下降到 15.5%.Pb²⁺的加入,不仅使 γ -PGA的二级结构在 pH 的影响下变化更显著,更使得 γ -PGA的二级结构变化在较低 pH 时便已达到,即在 pH 约为 γ -PGA的 pK_a(4.86)时, γ -PGA的二级结构变化开始变得稳定.

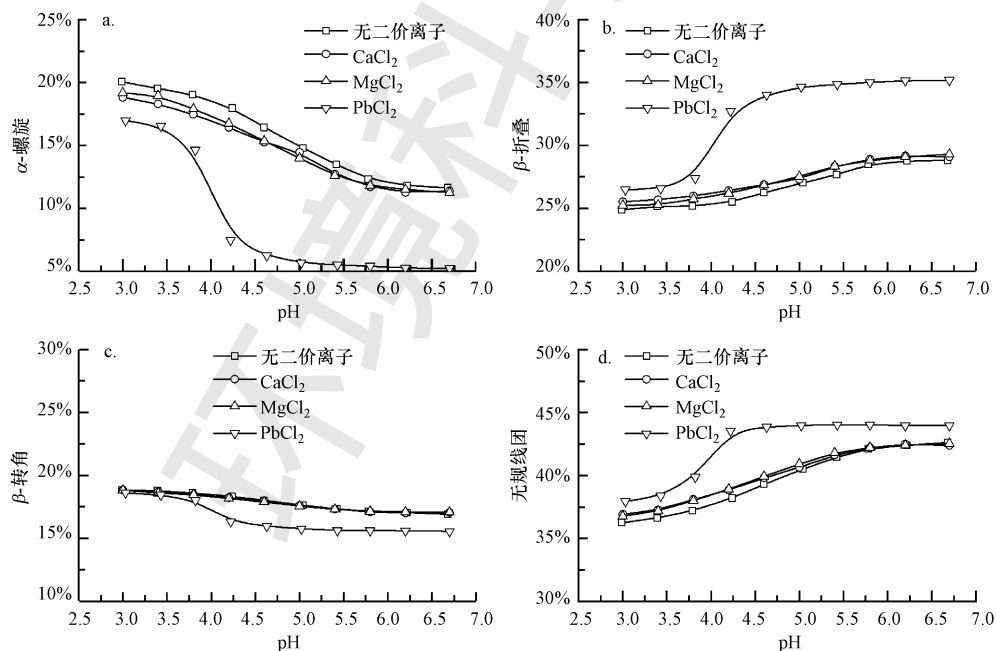


图 3 不同二价离子(Ca²⁺、Mg²⁺和 Pb²⁺)对 10 mg·L⁻¹ γ -PGA的 α -螺旋(a)、 β -折叠(b)、 β -转角(c)和无规线团(d)结构的影响(离子强度为 10 mmol·L⁻¹ NaF, Ca²⁺、Mg²⁺和 Pb²⁺浓度与 γ -PGA谷氨酸结构单元的摩尔比例均为 1:2)

Fig.3 Effect of different divalent ion (Ca²⁺, Mg²⁺ and Pb²⁺) on the α -helix (a), β -sheet (b), β -turn (c) and random coil (d) structures of 10 mg·L⁻¹ γ -PGA (All experiments were conducted with 10 mg·L⁻¹ γ -PGA in 10 mmol·L⁻¹ NaF; The values of Ca²⁺:glutamate, Mg²⁺:glutamate and Pb²⁺:glutamate molar ratios were the same, 1:2)

阳离子对 γ -PGA结构的影响取决于离子的性质,如尺寸、电荷密度、水合能力和电负性等

(Bostrom *et al.*, 2001). 在 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Pb^{2+} 这 3 种离子中, 只有 Pb^{2+} 具有改变 γ -PGA 二级结构的能力. 从表 2 中可以看出, 这种差异可能与以下原因有关: 首先 Pb^{2+} 具有较高的电负性以吸引 COO^- 基团 (Siao *et al.*, 2009); 其次 Pb^{2+} 自身的有效离子半径更大, 且能与更多的 H_2O 配位, 由于空间位阻效应, 这种较大的水合离子可能会破坏骨架中 CO 和 NH 之间的氢键.

表 2 Pb 、 Ca 和 Mg 的电负性、离子电荷、有效离子半径和第一水合层的水分子数

Table 2 Electronegativity values, ion charge, effective ionic radii and coordination H_2O number in first hydration shell of the Pb, Ca and Mg

元素	电负性 ^a	离子电荷	有效离子半径 / pm ^a	第一水合层水分子数
Pb	1.80	2 ⁺	129	7 ~ 10 (Bhattacharjee <i>et al.</i> , 2009)
Ca	1.00	2 ⁺	100	6 (Carl <i>et al.</i> , 2007)
Mg	1.31	2 ⁺	67	6 (Adrian-Scotto <i>et al.</i> , 2005)

注: ^a Speight J G, 2005. Lange's handbook of chemistry [M], 16th ed, McGraw-Hill, New York, NY.

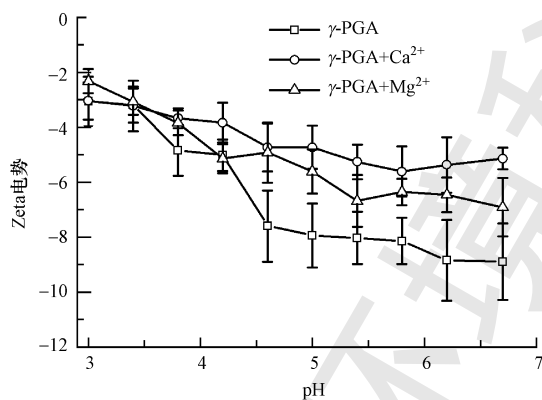


图 4 γ -PGA、 γ -PGA/ Ca^{2+} 、 γ -PGA/ Mg^{2+} ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度与 γ -PGA 谷氨酸结构单元的摩尔比例均为 1:2) 的 Zeta 电势

Fig.4 Zeta potentials of γ -PGA, γ -PGA/ Ca^{2+} and γ -PGA/ Mg^{2+} ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA, the values of Ca^{2+} : glutamate and Mg^{2+} : glutamate molar ratios were the same, 1:2)

Mclean 等研究了 γ -PGA 与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的结合特性 (Mclean *et al.*, 1990). pH 为 5.2 时, 当 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 与谷氨酸结构单元比例为 1:2 时, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 能够使 γ -PGA 吸附饱和, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的结合量相似, 均测定为约 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (γ -PGA 干重). 图 4 所示为 γ -PGA、 γ -PGA/ Ca^{2+} 、 γ -PGA/ Mg^{2+} (Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度

与 γ -PGA 谷氨酸结构单元的比例均为 1:2) 的 Zeta 电势. 在 pH 3.0 时, 由于 γ -PGA 未电离, Zeta 电势值为 $(-3.06 \pm 0.90) \text{ mV}$, 随着 pH 上升, γ -PGA 侧链上的羧基解离, Zeta 电势值逐渐下降, pH 为 6.7 时为 $(-8.90 \pm 1.39) \text{ mV}$. 在加入 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 后, 由于 γ -PGA 吸附了 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} , Zeta 电势值随着 pH 的上升而下降的速度变缓, 在 pH 为 6.7 时 γ -PGA/ Ca^{2+} 和 γ -PGA/ Mg^{2+} 的 Zeta 电势值分别为 $(-5.14 \pm 0.39) \text{ mV}$ 和 $(-6.91 \pm 1.07) \text{ mV}$. 结合 CD 光谱的结果可发现, 虽然 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 能够与 γ -PGA 结合, 但结合的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 却不会改变 γ -PGA 分子的二级结构.

图 5 所示为 Pb^{2+} 浓度对 γ -PGA/ Pb^{2+} 络合物二级结构的影响, 因为有一部分 Pb^{2+} 并未结合到 γ -PGA 上, 因此图 6 显示的则是对应的相同 Pb^{2+} 浓度下结合到 γ -PGA (干重) 上的 Pb^{2+} 的量. 从图 5 可知, γ -PGA/ Pb^{2+} 络合物的二级结构与 γ -PGA 的二级结构有显著差异. 当加入 Pb^{2+} 时, α -螺旋和 β -转角含量降低, β -折叠和无规卷曲含量增加. 如前所述, α -螺旋通过分子内氢键稳定, γ -PGA 在 pH 为 3.0 处为酸形式 (γ -PGA-H). 在 pH 3.0 下, 没有 COO^- 使 Pb^{2+} 络合. 随着 pH 的增加, COOH 基团的电离使 COO^- 可用于 Pb^{2+} 络合. 此外, 由于在较高 pH 下从棒状到球状的结构演变使得 γ -PGA 的分子构型变得更为松散 (Wang *et al.*, 2017), 使得 Pb^{2+} 更易进入分子链, 降低了 Pb^{2+} 进入 γ -PGA 的空间阻力.

随着 pH 从 3.0 增加到 6.7, Pb^{2+} 与 γ -PGA 的络合改变了 γ -PGA 分子的二级结构. 如前所述, γ -PGA 分子内存在着两种分子内氢键稳定酸性条件下的 γ -PGA 结构. 随着 pH 增加, 由于羧基基团的去质子化, 侧链羧基氧和骨架 NH 之间的分子内氢键被破坏. 然而, 骨架中 CO 和 NH 之间的氢键可能仍然稳定. 因此, 当 pH 从 3.0 增加到 6.7 时, γ -PGA 的 α -螺旋含量从 20.1% 降低到 11.7%. 加入 1:1 (Pb^{2+} : 谷氨酸结构单元) 的 Pb^{2+} 后, 由于空间位阻效应, 与羧基络合的大粒径水合 Pb^{2+} 可能进一步破坏骨架中 CO 和 NH 之间的氢键. 因此, 随着 pH 值从 3.0 增加到 4.2, Pb^{2+} 与 γ -PGA 的络合作用已使 γ -PGA 的 α -螺旋含量从 19.7% 迅速降低至 5.4%.

值得注意的是, 当 pH 高于 5.0 (接近 pK_a 值 4.86) 和 Pb^{2+} : 谷氨酸结构单元摩尔比率为 1:2 和 1:1 时, Pb^{2+} 与 γ -PGA 络合的二级结构相似且几乎与 pH 值无关. 而此时, 从图 6 可知, 相同情况下的 Pb^{2+}

吸附到 γ -PGA的量不同.因此,在 Pb^{2+} 吸附量逐渐增加的过程中,参与改变 γ -PGA构型的 Pb^{2+} 将逐渐达到饱和,其余吸附的 Pb^{2+} 并不影响 γ -PGA的构型.

Ho 等(2006)发现, γ -PGA的 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 盐溶解性很好.本研究发现,pH 5.0时,在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -PGA的浓度下, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度即使达到

$75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, γ -PGA溶液仍未出现絮凝,而 Pb^{2+} 浓度超过 $78\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, γ -PGA即被絮凝.从以上对 γ -PGA与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Pb^{2+} 结合以及二级结构的变化来看, γ -PGA对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Pb^{2+} 絮凝性能,可能与其二级结构的改变密切相关.

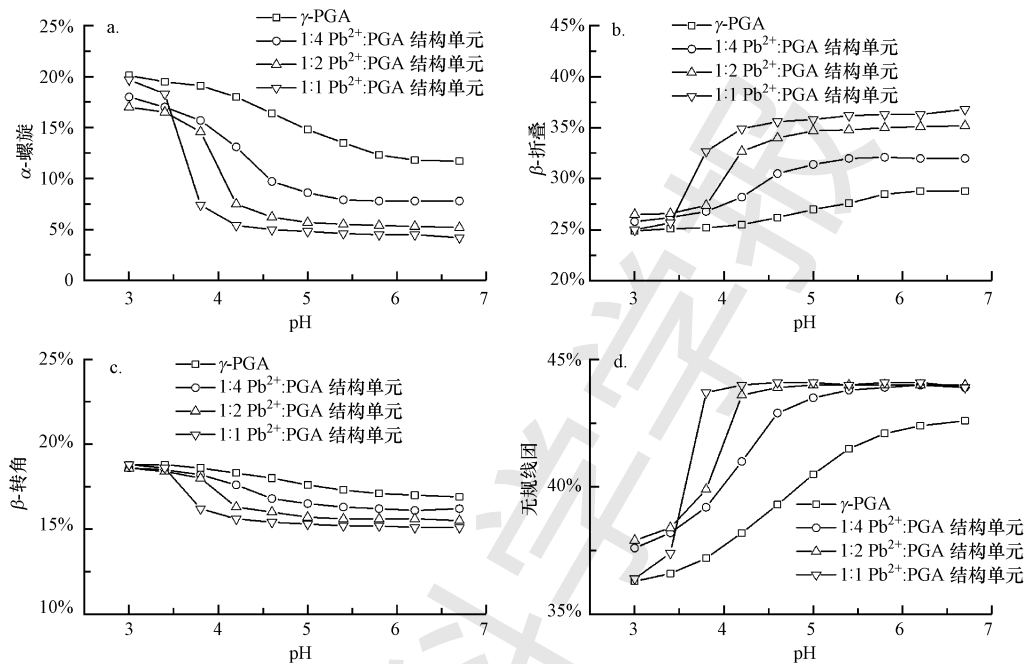


图5 不同铅离子浓度对 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -PGA的 α -螺旋(a)、 β -折叠(b)、 β -转角(c)和无规线团(d)结构的影响($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 离子强度, Pb^{2+} :谷氨酸结构单元摩尔比分别为1:4、1:2和1:1)

Fig.5 Effects of Pb^{2+} concentrations on the α -helix (a), β -sheet (b), β -turn (c) and random coil (d) structures of complexed Pb^{2+} with γ -PGA (All experiments were conducted with $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -PGA in $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF. The values of Pb^{2+} :glutamate molar ratios were 1:4, 1:2 and 1:1, respectively)

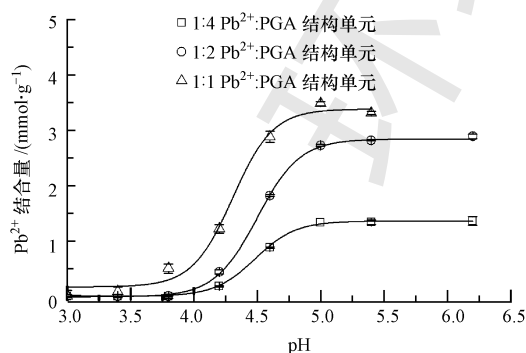


图6 不同铅离子浓度下 γ -PGA结合 Pb^{2+} 的量($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -PGA, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 离子强度, Pb^{2+} :谷氨酸结构单元摩尔比分别为1:4、1:2和1:1)

Fig.6 The amount of complexed Pb^{2+} with γ -PGA at different Pb^{2+} concentrations ($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -PGA, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, the values of Pb^{2+} :glutamate molar ratios were 1:4, 1:2 and 1:1, respectively)

3.4 红外光谱

金属离子与 γ -PGA的羧基以不同的方式络合,会影响其对称性,键合强度和键角(He *et al.*, 2000).因此,FTIR 光谱用于鉴定 γ -PGA羧基基团与金属离子络合前后的振动模式的频率差异.如图7a所示,pH 为3.0时 γ -PGA中 1728 cm^{-1} 附近的峰在pH 5.0和7.0下逐渐消失.这是由于 1728 cm^{-1} 附近的峰为COOH中的C=O伸缩振动,随着COOH的去质子化,COO⁻中的C=O位移至约 1595 cm^{-1} (不对称伸缩振动)和 1403 cm^{-1} (对称伸缩振动)(Garcia-Alvarez *et al.*, 2005).在pH 为5.0和7.0时, 1595 cm^{-1} 处的峰强度甚至与酰胺I(1643 cm^{-1})和酰胺II(1548 cm^{-1})重叠.在与 Pb^{2+} 络合后,COO⁻的不对称伸缩振动位移至约 1550 cm^{-1} ,与酰胺II带重叠.这表明 Pb^{2+} 与 γ -PGA的COO⁻强烈结合并显著

改变羧基基团的振动模式。

图 7b 显示了 pH 为 6.5 时不同 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\gamma\text{-PGA 谷氨酸单体结构})$ 和 $n(\text{Mg}^{2+}) : n(\gamma\text{-PGA 谷氨酸单体结构})$ 条件下 $\gamma\text{-PGA}/\text{Ca}^{2+}$ 和 $\gamma\text{-PGA}/\text{Mg}^{2+}$ 的红外光谱。1580 cm^{-1} 和 1403 cm^{-1} 分别对应于 $\gamma\text{-PGA}$ 中 COO^- 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动。在

$n(\text{Ca}^{2+}) : n(\gamma\text{-PGA 谷氨酸单体结构})$ 和 $n(\text{Mg}^{2+}) : n(\gamma\text{-PGA 谷氨酸单体结构})$ 范围从 0.5 变化到 2 时, 这两个红外吸收峰并没有变化, 这与 CD 光谱的结果一致, 表明 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的络合并没有改变 $\gamma\text{-PGA}$ 的分子结构。

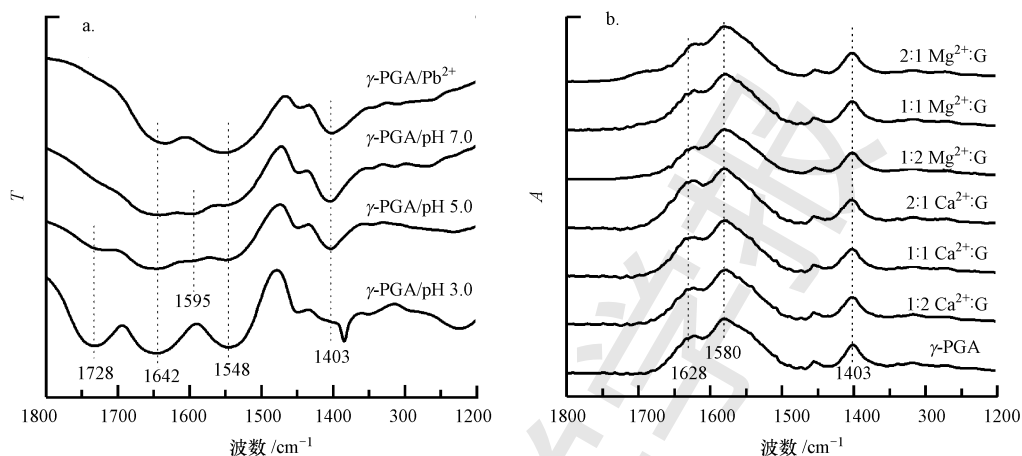


图 7 $\gamma\text{-PGA}/\text{Pb}^{2+}$ 、pH 3.0、5.0 和 7.0 时 $\gamma\text{-PGA}$ 的红外光谱 (a) 和不同 $\text{Ca}^{2+} : \text{谷氨酸结构单元摩尔比} (\text{Ca}^{2+} : \text{G})$ 和 $\text{Mg}^{2+} : \text{谷氨酸结构单元摩尔比} (\text{Mg}^{2+} : \text{G})$ 时 $\gamma\text{-PGA}/\text{Ca}^{2+}$ 和 $\gamma\text{-PGA}/\text{Mg}^{2+}$ 的 ATR-FTIR 谱图 (b)

Fig.7 FTIR spectra of $\gamma\text{-PGA}/\text{Pb}^{2+}$ complexation, $\gamma\text{-PGA}$ at pH 3.0, 5.0 and 7.0 (a) and ATR-FTIR spectra of $\gamma\text{-PGA}/\text{Ca}^{2+}$ and $\gamma\text{-PGA}/\text{Mg}^{2+}$ mixture at varying $\text{Ca}^{2+} : \text{glutamate}$ and $\text{Mg}^{2+} : \text{glutamate}$ molar ratios (b)

4 结论 (Conclusions)

1) pH 对 $\gamma\text{-PGA}$ 的二级结构具有显著影响, 而离子强度 ($0 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 $\gamma\text{-PGA}$ 的二级结构影响不大。

2) Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 虽然能够与 $\gamma\text{-PGA}$ 结合, 会影响 $\gamma\text{-PGA}$ 的 Zeta 电势, 但并不影响 $\gamma\text{-PGA}$ 侧链上羧基的振动模式, 也不影响 $\gamma\text{-PGA}$ 的二级结构。

3) Pb^{2+} 能够与 $\gamma\text{-PGA}$ 的 COO^- 强烈结合并显著改变羧基基团的振动模式, 同时显著影响 $\gamma\text{-PGA}$ 的二级结构。 Pb^{2+} 的加入不仅会破坏侧链和骨架之间的氢键, 还可能破坏骨架中 CO 和 NH 之间的氢键。在 Pb^{2+} 吸附量逐渐增加的过程中, 参与改变 $\gamma\text{-PGA}$ 构型的 Pb^{2+} 将逐渐达到饱和, 其余吸附的 Pb^{2+} 并不影响 $\gamma\text{-PGA}$ 的构型。

4) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Pb^{2+} 对 $\gamma\text{-PGA}$ 二级结构的不同影响取决于离子自身的性质, 即离子特异性, 一是 Pb^{2+} 具有较高的电负性以吸引 COO^- 基团, 二是 Pb^{2+} 自身的有效离子半径更大, 且能与更多的 H_2O 配位, 由于空间位阻效应, 这种较大的水合离子可能会破坏骨架中 CO 和 NH 之间的氢键。

参考文献 (References):

- Adrian S M, Mallet G, Vasilescu D, *et al.* 2005. Hydration of Mg^{++} : a quantum DFT and ab initio HF study [J]. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, 728(1/3): 231-242
- Agresti C, Tu Z G, Ng C. 2008. Specific interactions between diphenhydramine and alpha-helical poly (glutamic acid) - a new ion-pairing complex for taste masking and pH-controlled diphenhydramine release [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1): 226-233
- Bajaj I, Singhal R. 2011. Poly (glutamic acid) - an emerging biopolymer of commercial interest [J]. *Bioresource Technology*, 102(10): 5551-5561
- Bhatnagar A, Sillanpaa M. 2017. Removal of natural organic matter (NOM) and its constituents from water by adsorption - A review [J]. *Chemosphere*, 166: 497-510
- Bhattacharjee A, Hofer T S, Pribil A B, *et al.* 2009. Revisiting the hydration of Pb(II): A QMCF MD approach [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(39): 13007-13013
- Bostrom M, Williams D R M, Ninham B W. 2001. Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems [J]. *Physical Review Letters*, 87(16): 168103
- Carl D R, Moision R M, Armentrout P B. 2007. Binding energies for the inner hydration shells of Ca^{2+} : An experimental and theoretical investigation of $\text{Ca}^{2+} (\text{H}_2\text{O}) (x)$ complexes ($x = 5 \sim 9$) [J].

- International Journal of Mass Spectrometry, 265(2/3): 308-325
- d'Abzac P, Bordas F, van Hullebusch E, *et al.* 2010. Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 80(2): 161-168
- Decho A W, Gutierrez T. 2017. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems[J]. Frontiers in Microbiology, 8: 922
- Garcia A M, Alvarez J, Alla A, *et al.* 2005. Comb-like ionic complexes of cationic surfactants with bacterial poly(γ -glutamic acid) of racemic composition[J]. Macromolecular Bioscience, 5(1): 30-38
- He L M, Neu M P, Vanderberg L A. 2000. *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyl exopolymer: physicochemical characterization and U(VI) interaction [J]. Environmental Science & Technology, 34(9): 1694-1701
- Mclean R J C, Beauchemin D, Beveridge T J. 1992. Influence of oxidation-state on iron-binding by *Bacillus licheniformis* capsule[J]. Applied and Environmental Microbiology, 58(1): 405-408
- Mclean R J C, Beauchemin D, Clapham L, *et al.* 1990. Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 56(12): 3671-3677
- Ogunye A, Bhat A, Irorere V U, *et al.* 2015. Poly-gamma-glutamic acid: production, properties and applications [J]. Microbiology-Sgm, 161: 1-17
- Sakamoto S, Kawase Y. 2016. Adsorption capacities of poly-gamma-glutamic acid and its sodium salt for cesium removal from radioactive wastewaters [J]. Journal of Environmental Radioactivity, 165: 151-158
- Seviour T, Derlon N, Dueholm M S, *et al.* 2019. Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis[J]. Water Research, 151: 1-7
- Siao F Y, Lu J F, Wang J S, *et al.* 2009. In vitro binding of heavy metals by an edible biopolymer poly(γ -glutamic acid) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(2): 777-784
- Sirisansaneeyakul S, Cao M F, Kongklom N, *et al.* 2017. Microbial production of poly-gamma-glutamic acid [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 33(9): 173
- Speight J G, 2005. Lange's handbook of chemistry [M]. 16th ed, McGraw-Hill, New York, NY.
- Tourney J, Ngwenya B T. 2014. The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology [J]. Chemical Geology, 386: 115-132
- Wang L L, Chen J T, Wang L F, *et al.* 2017. Conformations and molecular interactions of poly-gamma-glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions [J]. Scientific Reports, 7:12787
- Xu S, Wang Z, Gao Y, *et al.* 2015. Adsorption of rare earths(III) using an efficient sodium alginate hydrogel cross-linked with poly-gamma-glutaminate[J]. Plos One, 10(5): e0124826
- Yao J, Xu H, Wang J, *et al.* 2007. Removal of Cr(III), Ni(II) and Cu(II) by poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 18(2): 193-204
- Yin Y R, Hu Y Y, Xiong F. 2013. Biosorption properties of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from *Aspergillus fumigatus* and determined by polarographic method [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 185(8): 6713-6718
- Zanuy D, Aleman C, Munoz G S. 1998. On the helical conformation of un-ionized poly(γ -D-glutamic acid) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 23(3): 175-184