

## 小球藻锌结合类金属硫蛋白的结构表征及抗菌活性

李连平<sup>1</sup>, 张小东<sup>2</sup>, 黄志勇<sup>1\*</sup>, 鄢庆彬<sup>2</sup>, 梁英<sup>2</sup>, 徐同玲<sup>2</sup>

(1.集美大学生物工程学院,福建 厦门 361021;

2.集美大学水产学院,福建 厦门 361021)

**摘要:**小球藻经 60  $\mu\text{mol/L}$  的锌胁迫培养 5 d 后,离心收集藻泥,经超声波细胞破碎后,离心得到上清液即蛋白质粗提液,再经葡聚糖凝胶层析柱 G-75 及脱盐柱 G-25 分离、纯化后,收集的蛋白组分经真空冷冻干燥后获得小球藻锌结合蛋白。通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳、氨基酸组成及紫外光谱等方法进行表征,测得该蛋白的分子量约为 8.2 ku,半胱氨酸含量为 15.4%,具有金属硫蛋白典型的紫外光谱特征,称为类金属硫蛋白(Zn-MT-like proteins)。试验采用琼脂糖孔穴扩散法,研究了小球藻 Zn-MT-like 蛋白对 3 种细菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌)和 3 种真菌(青霉菌、曲霉菌、酵母菌)的抗菌活性,并与兔肝 Zn-MTs 的抗菌能力进行比较。结果表明,小球藻 Zn-MT-like 蛋白对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌)和霉菌(青霉、曲霉)具有显著的抗菌活性,1 mg/mL 的 Zn-MT-like 蛋白对金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、青霉和曲霉的抑菌圈直径分别为 13.2、17.4、7.2 和 9.8 mm;而对大肠杆菌、酵母菌则无抗菌活性。同样条件下,未加锌胁迫的小球藻蛋白质本身和兔肝 Zn-MTs 并不具有这些抗菌能力。小球藻 Zn-MT-like 蛋白抗菌活性的发现为进一步综合利用小球藻提供了实验基础。

**关键词:**小球藻;类金属硫蛋白;结构表征;抗菌活性

**中图分类号:**Q 946.1; S 917

**文献标识码:**A

多年来,人们已从大量海洋藻类中筛选出具有抗菌和抗真菌的物质,包括脂肪酸、酚类、丹宁、类萜、多糖以及醇类等<sup>[1]</sup>。上世纪四十年代,研究人员从小球藻中分离得到一种具有抗菌和自身毒性功能的脂肪酸混合物,称为小球藻素(chlorellin)<sup>[2-4]</sup>。小球藻营养物质十分丰富,本身也具有一定的抗菌活性,曾有研究者发现,经口给予接种大肠杆菌小鼠的小球藻热水粗提物,可增强对肝肾等器官中细菌的清除作用,从而达到消炎的目的<sup>[5]</sup>。金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是一类低分子量、高巯基含量,且能大量结合金属离子的蛋白质<sup>[6]</sup>。与一般蛋白质不同,由于不含芳香族氨基酸,该蛋白在 280 nm 没有吸收峰,而在 254 nm 有一肩峰,酸性条件下此吸收峰

减弱<sup>[7-8]</sup>。MTs 具有许多生理功能,如抗氧化、抗肿瘤和解毒等<sup>[9]</sup>。然而针对小球藻金属结合蛋白的结构表征和抗菌活性研究却尚未见有报道。本文以锌诱导海洋小球藻(*Chlorella vulgaris*)提取类金属硫蛋白,研究其结构特征及抗菌活性,为进一步开发利用小球藻提供实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

2-16 型高速离心机:德国 SIGMA 公司; PGX 多段光照培养箱:宁波莱福科技有限公司;7500a 型电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)、1200 型高效液相色谱(HPLC):美国安捷伦科技有限公司;TKA-Genpure 超纯水设备:德国 TKA 公司。

收稿日期:2009-01-05 修回日期:2009-07-10

资助项目:国家自然科学基金项目(40771185);福建省科技计划重点项目(2007Y0028);福建省基金项目(2009J01034);厦门市科技项目(3502Z20055025);集美大学创新团队基金资助项目(2006A003)

通讯作者:黄志勇,E-mail:zhyhuang@jmu.edu.cn

酵母浸膏、牛肉浸膏、细菌学蛋白胨(BR级,广东环凯微生物科技有限公司);葡萄糖、氯化钾(AR级,汕头市达濠精细化学品公司);乙酸钠(AR级,上海联亿化工试剂有限公司);氯化钠(AR级,汕头市西陇化工厂有限公司);甲酸,三羟甲基氨基甲烷(AR级,均为国药集团化学试剂有限公司);琼脂(福建泉州市泉港化工厂);金属硫蛋白(湖南麓谷生物技术有限公司,纯度60%)。

### 1.2 实验受体菌和固体培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)、黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、啤酒酵母菌(*Brewer's yeast*),以上实验受体菌均由集美大学生物工程学院杨秋明老师提供。

牛肉膏蛋白胨培养基:0.3%牛肉膏、1%蛋白胨、0.5%氯化钠、0.8%~1%琼脂,pH 7.0~7.2。

麦氏培养基:0.1%葡萄糖、0.18%氯化钾、0.25%酵母浸膏、0.82%醋酸钠、0.75%~1%琼脂。

酵母膏麦芽汁培养基:0.3%麦芽粉、0.01%酵母浸膏、2.5%~5%琼脂。

以上培养基均121℃高压灭菌待用。

### 1.3 实验方法

小球藻锌结合类金属硫蛋白的制取 小球藻,由集美大学水产学院周立红教授提供藻种,经本实验室以砂滤海水配制营养盐(1 g/L NaHCO<sub>3</sub>,0.5 g/L KNO<sub>3</sub>,0.02 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.3 mg/L V<sub>B1</sub>,1.0 μg/L V<sub>B12</sub>)进行扩大培养。待小球藻培养至对数生长中期,加入ZnCl<sub>2</sub>至锌的浓度为60 μmol/L,诱导培养8 d,离心收集藻泥。经EDTA和超纯水清洗后,藻泥按一定比例与10 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)混合成悬浮液并用超声波细胞破碎,经离心(4 000 r/min,10 min),上清液即蛋白质粗提液。粗提液注入凝胶层析柱G-75(φ3.0 cm×80 cm),用10 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)洗脱,洗脱液经紫外检测(254 nm)和ICP-MS检测锌信号。收集含锌量较高的蛋白质组分。经真空冷冻干燥后用超纯水溶解,再经脱盐柱G-25(φ1.5 cm×30 cm)用纯水淋洗脱盐纯化,收集锌结合蛋白质部分并冻干后备用。

小球藻锌结合蛋白的分子量 按Tricine-SDS-PAGE法<sup>[10]</sup>测定小球藻锌结合蛋白的分子量。

小球藻锌结合蛋白的紫外光谱 将脱盐后的小球藻蛋白样品用超纯水溶解,用6 mol/L HCl或NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O调pH至8.0和2.0,扫描其在不同pH下的紫外吸收光谱。

小球藻锌结合蛋白的氨基酸组成分析 参照GB/T 5009.124-2003食品中氨基酸的测定法<sup>[11]</sup>。

小球藻类金属硫蛋白抗菌活性实验 将实验受体菌转接至斜面,待受体菌生长至对数生长期后,用0.85%的生理盐水充分洗脱,制成OD<sub>550</sub>约为0.3的菌悬液,此时菌悬液浓度约为1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL。参照琼脂糖孔穴扩散法<sup>[12]</sup>,取100 mL灭菌过的培养基(牛肉膏蛋白胨培养基、麦氏培养基、酵母膏麦芽汁培养基),冷却至40~45℃时,加入500 μL的上述菌悬液,与之充分混匀后,迅速倒入灭菌过的平板。待凝固后用打孔器在平皿中打3个直径为4 mm的小孔,并在每个小孔中分别加入1 mg/mL小球藻Zn-MT-like蛋白20 μL,置于恒温培养箱培养(细菌36~38℃培养18~24 h,真菌28~30℃培养48~72 h),然后分别观察并测量抑菌圈直径(取3次平均值),以上步骤均为无菌操作。

此外,为考察对照组及兔肝MTs蛋白的抗菌活性,试验以未加锌胁迫培养的小球藻细胞破碎上清液经冻干后作为对照组。分别配制浓度为1 mg/mL的对照组及兔肝MTs溶液,在相同的抗菌活性实验条件下,测定它们的抗菌活性。

数据处理方法 小球藻Zn-MT-like蛋白的抗菌差异性采用新复极差测验(即SSR法)进行Duncan氏多重比较检验<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 小球藻锌结合蛋白的分离结果

经锌诱导的小球藻蛋白质粗提液用凝胶层析柱G-75分离的结果如图1所示。图1第37管处有一个强的紫外吸收峰,对应的锌信号则很低,由于外观呈现绿色,可能是一个分子量较大的色素组分;而位于第101管处的另一个组分峰其紫外吸收强度较低,但相应的锌信号则很强,由于该峰的洗脱位置与兔肝金属硫蛋白(Zn-MTs)的位置

一致,可知该峰为本试验所要提取的锌结合蛋白组分。收集从第95管至107管的洗脱液,经真空冷冻干燥后用纯水溶解,经G-25层析柱脱盐,收集后冻干即得到小球藻锌结合蛋白质组分。

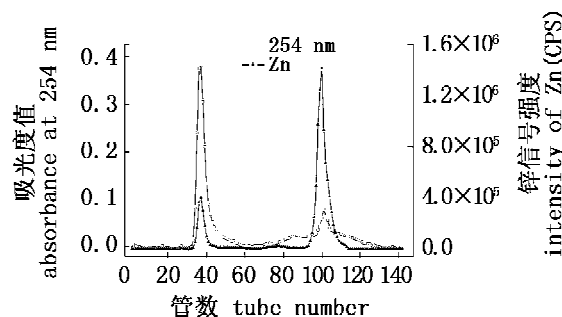


图1 球藻细胞提取液经G-75凝胶柱层析分离的色谱图  
Fig.1 Gel filtration (Sephadex G-75) profiles of cell extract from *C. vulgaris* stressed with 60  $\mu\text{mol/L}$  of zinc  
Open square; absorption at 254 nm; closed triangle; zinc signal detected with ICP-MS.

## 2.2 小球藻锌结合蛋白分子量

由图2可知,所提取的小球藻锌结合蛋白按Tricine-SDS-PAGE法测定其分子量约为8.2 ku,比兔肝Zn-MTs的分子量(约为6.8 ku)略大些。此外,从电泳图中可知,所提取的小球藻锌结合蛋白质纯度较高。

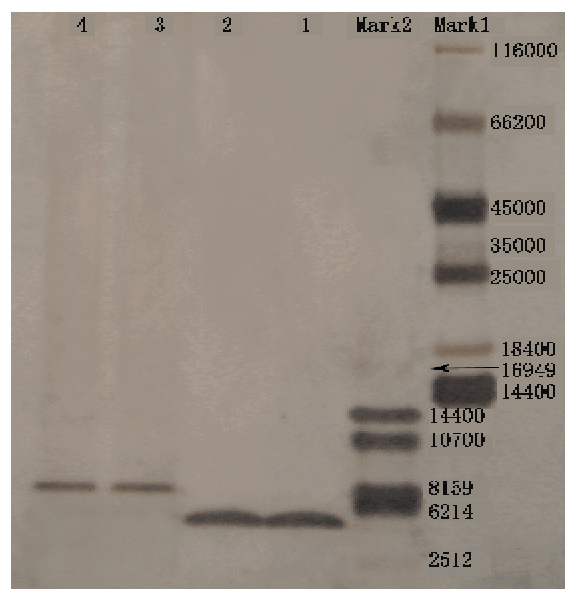


图2 小球藻锌结合蛋白的电泳图  
1,2.泳道为兔肝Zn-MTs标准;3,4.泳道为小球藻Zn结合蛋白提取物。  
Fig.2 Tricine-SDS-PAGE of Zn-binding proteins and Zn-MTs  
Lane 1, 2; Zn-MTs from rabbit liver; Lane 3, 4; Zn-binding proteins from *C. vulgaris*.

## 2.3 小球藻锌结合蛋白的紫外光谱特征

小球藻锌结合蛋白组分在pH为2.0及8.0条件下的紫外吸收光谱如图3所示。当pH 8.0时,蛋白质在254 nm处有一肩峰,而pH为2.0时此峰消失。此外,无论在酸性或在弱碱性条件下,该蛋白在280 nm处的吸收都很弱,而在190 nm处有较强的吸收峰。

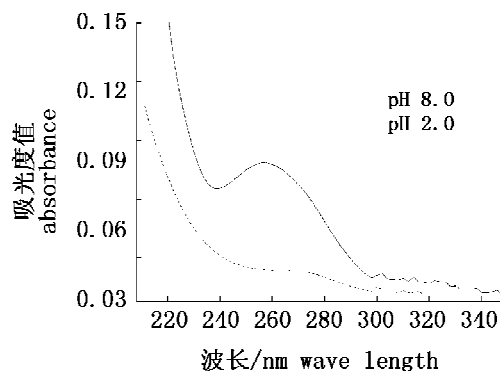


图3 小球藻锌结合蛋白的紫外光谱特征  
Fig.3 Absorbance spectrum of Zn-binding proteins from *C. vulgaris*

## 2.4 小球藻 Zn-MT-like 蛋白的氨基酸组成

小球藻 Zn-MT-like 蛋白的氨基酸组成(表1)。每个蛋白质分子含78个氨基酸残基。其中,必需氨基酸如:赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸有31个,占39.7%;半胱氨酸有12个,占15.4%。此外,分子中还含有3个组氨酸和2个酪氨酸等芳香族氨基酸等。

## 2.5 小球藻 Zn-MT-like 蛋白的抗菌活性

**抗菌活性** 实验发现,在各实验浓度下小球藻 Zn-MT-like 蛋白对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)均无抑制作用,而对两种革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌)则均表现出明显的抑制作用。如表2所示,随着Zn-MT-like 蛋白浓度的升高,其抗菌活力呈上升趋势。当Zn-MT-like 蛋白浓度为1.0 mg/mL时,Zn-MT-like 蛋白对金黄色葡萄球菌与枯草芽胞杆菌的抑菌圈直径分别为13.2和17.4 mm;而当Zn-MT-like 蛋白浓度下降为0.01 mg/mL时,对两种革兰氏阳性菌已无明显的抑制作用。同时,发现对照组对大肠杆菌无抑制作用,而对金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌抑制则很弱,1.0 mg/mL的对照组对这两种菌的抑菌圈直径分别仅为0.5和0.9 mm。

由此可见:由锌诱导的小球藻 Zn-MT-like 蛋白具有较高的抗菌活性,其抗菌活力约为对照组的 20 倍。此外,实验发现,兔肝 Zn-MTs 对以上的 3 种细菌均无抗菌活性。

表 1 小球藻 Zn-MT-like 蛋白的氨基酸组成  
Tab.1 Amino acid content and composition of Zn-MT-like proteins from *C. vulgaris*

氨基酸 amino acid	氨基酸残基(mol) amino-acid residues	氨基酸残基个数 amino-acid residues per mole
Asp	4.1	4
Thr	4.4	4
Ser	5.6	5
Glu	4.1	4
Gly	5.8	5
Ala	5.6	5
Cys	12.2	12
Val	4.8	4
Met	1.6	2
ILe	3.2	3
Leu	6.7	6
Tyr	1.9	2
Phe	11.5	11
Lys	5.6	5
His	3.0	3
Arg	1.1	1
Pro	2.3	2
总量 total		78

表 2 小球藻 Zn-MT-like 蛋白对细菌的抑制作用  
(抑菌圈直径,mm)  
Tab. 2 Anti-bacterial activities of Zn-MT-like proteins from *C. vulgaris*  
(Diameters of inhibition zone, mm)

细菌 bacteria	Zn-MT-like 蛋白浓度(mg/mL) concentrations of Zn-MT-like proteins					
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0.0	9.2	10.8	12.9	14.6	17.4
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.0	5.6	7.1	8.9	11.0	13.2

抗真菌活性 表 3 结果表明,小球藻 Zn-MT-like 蛋白对啤酒酵母无抑制作用,而对两种霉菌(青霉、曲霉)均有一定的抑制能力。1 mg/mL 的 Zn-MT-like 蛋白对青霉菌与曲霉菌的抑菌圈直径分别为 7.2 和 9.8 mm,但随着 Zn-MT-like 蛋白浓度下降,其抗菌活力迅速下降,当 Zn-MT-

like 蛋白浓度为 0.1 mg/mL 时,对两种霉菌已无抑制作用。而对照组和兔肝 Zn-MTs 对此 3 种真菌均无抑制作用。

表 3 小球藻 Zn-MT-like 蛋白对真菌的抑制作用  
(抑菌圈直径,mm)

Tab. 3 Anti-fungal activities of Zn-MT-like proteins from *C. vulgaris*  
(Diameters of inhibition zone, mm)

真菌 fungus	Zn-MT-like 蛋白浓度(mg/mL) concentrations of Zn-MT-like proteins					
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
产黄青霉菌 <i>P. chrysogenum</i>	0.0	1.2	2.5	3.9	5.7	7.2
黑曲霉菌 <i>A. niger</i>	0.0	2.4	4.3	6.1	7.9	9.8
啤酒酵母菌 <i>B. yeast</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

小球藻 Zn-MT-like 蛋白对 4 种敏感菌的抗菌差异性统计 小球藻 Zn-MT-like 蛋白对 4 种敏感菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黄青霉、黑曲霉)的差异性统计如表 4 所示。随着 Zn-MT-like 蛋白浓度的增大,对 4 种敏感菌的抑菌圈直径也逐渐增大,表明对敏感菌的抑制作用逐渐增强。采用 Duncan 多重比较检验的结果表明,当 Zn-MT-like 蛋白浓度达 1.0 mg/mL 时,其抑菌效果显著增大。

表 4 不同浓度 Zn-MT-like 蛋白抑菌作用的差异性检验  
Tab. 4 Differences of anti-microbial activities of Zn-MT-like proteins at different concentrations

Zn-MT-like 蛋白 浓度(mg/mL) concentrations of Zn-MT-like proteins	抑菌圈平均直径 (mm) mean diameters of inhibition zone	标准偏差 (%) standard deviation	差异性 difference
0.2	4.60	3.59	$P > 0.05$
0.4	6.18	3.60	$P > 0.05$
0.6	7.95	3.92	$P > 0.05$
0.8	9.80	4.22	$P > 0.05$
1.0	11.90	5.65	$P < 0.05$

### 3 讨论

本实验以锌诱导小球藻提取锌结合蛋白质,经 Tricine-SDS-PAGE 测定其分子量约为 8.2 ku。但不同微藻经重金属诱导产生的金属结合蛋白的分子量存在较大差异。例如,郭详学等<sup>[14]</sup>发现单细胞蓝藻(*Synechococcus* sp. PCC 7942)锌结合类金属硫蛋白的分子量为 8.75 ku;陈正佳等<sup>[15]</sup>报

道集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803) 锌结合类金属硫蛋白的分子量为 6.986 ku, 而 Yoshida 等<sup>[8]</sup>报道一种无核绿藻的镉结合蛋白的分子量却为 11.5 ku。此外, 本研究小组发现, 同样的小球藻经不同重金属(如 Zn 和 Cu)胁迫诱导的金属结合蛋白其分子量也有较大的差异<sup>[16]</sup>。

实验考察了小球藻锌结合蛋白组分在不同 pH 条件下的光谱特征, 并与同样试验条件下兔肝 Zn-MTs 的结果进行对比。发现在酸性条件下, 该蛋白质于 254 nm 处的吸收峰消失, 且无论在酸性还是在弱碱性条件下 280 nm 处的吸收都很弱。图 3 的实验结果与兔肝 MTs 的光谱特征<sup>[7-8]</sup>十分相似。其中, 酸性介质导致 254 nm 处吸收峰的消失是因为此时锌从蛋白质中解离出来, 形成脱金属的蛋白质, 使其吸光度下降<sup>[8]</sup>; 而 280 nm 处的弱吸收则是 MTs 特有的光谱现象, 说明蛋白质分子中芳香氨基酸含量很少。此外, 在 190 nm 处有较强吸收峰是由蛋白质肽键吸收峰产生的。本研究小组利用不同的液相色谱与质谱方法对小球藻锌结合蛋白进行结构表征, 结果也表明小球藻锌结合蛋白与哺乳动物金属硫蛋白在结构上有一定的相似性<sup>[16]</sup>。因此, 将小球藻锌结合蛋白称为类金属硫蛋白(Zn-MT-like)。

小球藻 Zn-MT-like 蛋白的氨基酸组成分析结果也进一步表明了此蛋白质与哺乳动物金属硫蛋白在结构上有一定的相似性。由表 1 可知, 小球藻 Zn-MT-like 蛋白的半胱氨酸(Cys)含量虽比一般哺乳动物金属硫蛋白(如兔肝 MTs)的半胱氨酸含量(33%)少, 但仍达到 15.4%。而此蛋白质含有少量的芳香族氨基酸和组氨酸。因此, 小球藻 Zn-MT-like 蛋白与哺乳动物金属硫蛋白在结构上虽有一定的相似性, 但也存在明显的差异。事实上, 不同微藻产生的类金属硫蛋白其氨基酸组成也不尽相同, 如由蓝藻获得的类金属硫蛋白含有 58 个氨基酸, 其中半胱氨酸含量仅占 5% 左右<sup>[15]</sup>。

表 2 和表 3 的抗菌活性试验结果表明, 小球藻 Zn-MT-like 蛋白对革兰氏阳性菌和霉菌具有抑制作用, 且对革兰氏阳性菌的抗菌能力高于霉菌, 而对大肠杆菌和啤酒酵母则没有抑菌作用。小球藻抗菌活性与其藻种、活性成分、提取方法以及菌株本身的抗性等多种因素有关。如蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 只对大肠杆菌有较弱

的抑制作用, 而对真菌、革兰氏阳性菌无抑制作用<sup>[17]</sup>; 而娇柔塔胞藻(*Pyramidomonas delicatula*) 对革兰氏阳性菌以及革兰氏阴性菌均有一定的抑制活性<sup>[18]</sup>。即使同一种藻种, 提取的不同活性物质其抗菌菌谱也不同。如海水小球藻(*Chlorella pacifica*) 多糖提取物对多种细菌和真菌都有显著的抑制作用, 而其蛋白质提取物却只对部分细菌和真菌有一定的抑制作用<sup>[19]</sup>。此外, 不同有机溶剂提取的蛋白核小球藻脂溶性化合物其抗菌活性也随提取溶剂的不同, 抗菌谱及抗菌活性也有所不同<sup>[20]</sup>。本实验中, 小球藻 Zn-MT-like 蛋白对革兰氏阴性菌无抑制作用, 而对革兰氏阳性菌以及霉菌均有显著的抑制活性。已报道的研究结果表明, 藻类提取物对细菌的抑制能力往往大于对真菌的抑制<sup>[21]</sup>, 本实验的结果也符合此规律。同时试验发现未加金属诱导的小球藻蛋白本身的抗菌活性极弱, 而兔肝 MTs 的抗菌性也很弱。因此, 小球藻 Zn-MT-like 蛋白的抗菌活性试验结果为进一步开发利用小球藻提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 张成武. 微藻中的生物活性物质 [J]. 中国海洋药物, 1992, 12(3): 20-29.
- [2] Pratt R, Daniels T C, Eiler J J, et al. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella* [J]. Science, 1944, 99(2574): 351-352.
- [3] Pratt R, Fong J. Studies on *Chlorella vulgaris* II. Further evidence that *Chlorella* cells form a growth-inhibiting substance [J]. Amer J Bot, 1940, 27: 431-436.
- [4] Pratt R. Studies on *Chlorella vulgaris*. XI. Relation between surface tension and accumulation of Chlorellin [J]. Amer J Bot, 1948, 35: 634-637.
- [5] Bitencourt F S, Figueiredo J G, Mota M R L, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* [J]. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol, 2008, 377(2): 139-148.
- [6] Kabziński A K M. The determination of environmental and industrial exposure to heavy metals based on the quantitative isolation of metallothionein from human fluids with application of covalent affinity chromatography with thiol-disulphide interchange gel as a solid-phase extraction support [J]. Talanta, 1998, 46(2): 335-346.

- [7] Huang Z Y, Zhang Q, Chen J, *et al.* Bioaccumulation of metals and induction of metallo thioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead [J]. *Appl Organomet Chem*, 2007, 21 (2): 101 - 107.
- [8] Yoshida N, Ishii K, Okuno T, *et al.* Purification and characterization of cadmium-binding protein from unicellular alga *Chlorella sorokinian* [J]. *Curr Microbiol*, 2006, 52(6): 460 - 463.
- [9] Nordberg M. Metallothioneins; historical review and state of knowledge [J]. *Talanta*, 1998, 46 (2): 243 - 253.
- [10] 戴志远,任民,张燕平. 电泳和层析方法对梅鱼蛋白酶解产物的分离分析[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(4): 101 - 105.
- [11] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.124-2003. 食品中氨基酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [12] Kim I H, Lee D G, Lee S H, *et al.* Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12(5): 579 - 582.
- [13] 赵满来. 运用 Excel 软件进行多重比较[J]. *甘肃农村科技*, 2003, (2-3): 47 - 48.
- [14] 郭祥学,陈正佳,但春涛,等. 聚球藻类金属硫蛋白的纯化及部分性质的研究[J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(6): 699 - 703.
- [15] 陈正佳,李晓凡,施定基,等. 集胞藻类金属硫蛋白的纯化、性质和溶液构象的研究[J]. *植物学报*, 1999, 41(2): 150 - 155.
- [16] Huang Z Y, Li L P, Huang G L, *et al.* Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, 91 (1): 54 - 61.
- [17] 江红霞,郑怡. 8种微藻抗菌活性研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 18(2): 117 - 120.
- [18] 江红霞. 娇柔塔胞藻脂溶性化合物的抑菌活性及成分分析[J]. *安徽农学通报*, 2007, 13(17): 34 - 35.
- [19] 陈晓清,郑怡,林雄平. 二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 21(2): 76 - 79.
- [20] 江红霞,郑怡,林雄平. 蛋白核小球藻脂溶性化合物的抑菌活性及成分分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(1): 1 - 5.
- [21] Padmakumar K, Ayyakkannu K. Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from the Southern Coasts of India [J]. *Bot Mar*, 1997, 40 (6): 507 - 515.

## Studies on the structural characterization and antimicrobial activities of Zn-MT-like proteins induced from *Chlorella vulgaris*

LI Lian-ping<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-dong<sup>2</sup>, HUANG Zhi-yong<sup>1\*</sup>,  
YAN Qing-pi<sup>2</sup>, LIANG Ying<sup>2</sup>, XU Tong-ling<sup>2</sup>

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Chlorella vulgaris* was cultivated for five days under the stress of 60  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ). After harvest by centrifugation, the algal cells were washed with EDTA and water, and were homogenized by a supersonic cell disintegrator. After centrifugation, the supernatant, a crude protein-containing extract, was separated and purified with a gel filtration column (Sephadex G-75, 3.5 i. d.  $\times$  80 cm) and a desalting gel filtration column (Sephadex G-25, 1.5 i. d.  $\times$  30 cm). The obtained Zn-binding proteins were characterized with several analytical methods. Results showed that the molecular weight of the proteins measured with tricine-SDS-PAGE was about 8.2 ku, and the cysteine content of the proteins was 15.4%. In addition, the characteristic ultraviolet spectrum of the proteins was found to be similar to that of the standard MTs from rabbit liver. Therefore, the Zn-binding proteins were referred as metallothionein-like (Zn-MT-like) proteins. Based on the agar hole pervasion method, the activities of anti-bacterial and antifungal of Zn-MT-like proteins were tested. The results showed that Zn-MT-like proteins strongly exhibited the antimicrobial activities against gram-positive bacteria (including *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*), *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*, but was insensitive to *Escherichia coli* and brewer's yeast. The diameters of inhibition zone for 1 mg/mL of Zn-MT-like protein were 13.2, 17.4, 7.2 and 9.8 mm for *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. chrysogenum* and *A. niger*, respectively. However, no antimicrobial activity was found for the standard Zn-MTs from rabbit liver. The antimicrobial activities of Zn-MT-like proteins from *C. vulgaris* may be helpful for the further comprehensive development and utilization of the alga.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*; zinc-binding metallothionein-like (Zn-MT-like) proteins; structural characterization; antimicrobial activity

**Corresponding author:** HUANG Zhi-yong. E-mail: zhyhuang@jum.edu.cn