

文章编号: 1000-0615(2017)07-1126-07

DOI: 10.11964/jfc.20160410349

锌胁迫对海洋小球藻生长和金属硫蛋白诱导的影响

彭爱红, 高爽, 陈俊, 庄梅珍, 王凡,
陈晓梅, 林郑忠, 黄志勇*

(集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

摘要: 研究锌离子胁迫对海洋小球藻生长和金属硫蛋白诱导的影响, 当小球藻达到对数生长期, 用不同离子浓度(5、10、20、50和100 $\mu\text{mol/L}$)的锌盐(氯化锌、柠檬酸锌、乙酸锌和葡萄糖酸锌)分别进行胁迫培养, 通过测定小球藻的生物量和锌结合金属硫蛋白含量, 考察锌胁迫对海洋小球藻的生物量、热稳定蛋白含量以及锌结合金属硫蛋白含量的影响。结果显示, 当浓度分别小于5和10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 柠檬酸锌和氯化锌对小球藻生长无显著抑制作用; 而浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 乙酸锌和葡萄糖酸锌对小球藻生长即产生显著抑制, 且抑制作用皆随锌离子浓度的增加而增大。与对照组相比, 4种锌盐胁迫3 d后小球藻产生的热稳定蛋白含量极显著增加, 其中以锌离子浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖酸锌对小球藻胁迫产生的热稳定蛋白含量最高, 达到34.5 mg/g(湿藻泥)。同样在此浓度的葡萄糖酸锌胁迫下, 小球藻诱导产生的锌结合金属硫蛋白的含量最高。研究表明, 用锌离子浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖酸锌对小球藻胁迫培养, 诱导产生的锌结合金属硫蛋白含量达到最高。

关键词: 海洋小球藻; 锌胁迫; 葡萄糖酸锌; 生物量; 金属硫蛋白

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

海洋小球藻(*Chlorella* sp.)是一种富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素和多种维生素等营养成分的单细胞藻类, 属于绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、绿球藻目(Chlorococcales)、小球藻科(Chlorellaceae)^[1]。研究表明, 海洋小球藻被认为是一种理想的蛋白资源, 它易于大规模高密度培养、生产成本低廉、来源丰富, 且藻细胞内含有类金属硫蛋白(metallothioneins-like proteins, 简称MTs-like蛋白)^[2-6]。研究证明, 海洋小球藻经重金属(锌、铜等)诱导可产生与哺乳动物MTs有一定相似性的MTs-like蛋白^[5], 按第二届金属硫蛋白国际会议的定义, 统称为MTs^[7]。由于目前从哺乳动物提取MTs的原材料昂贵、工艺复杂, 造成MTs的生产成本很高。因此, 利用小球藻经锌等诱导产生MTs的方法有可能成为生物

制取MTs的一条新途径。

目前, 利用锌胁迫小球藻诱导产生MTs的研究报道较少^[8], 未见对不同锌盐进行胁迫研究的相关报道。因此, 本实验考察不同锌盐(氯化锌、柠檬酸锌、乙酸锌和葡萄糖酸锌)在不同锌离子浓度(5、10、20、50和100 $\mu\text{mol/L}$)下对小球藻生长和MTs诱导的影响, 为进一步开展小球藻MTs的提取开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

海洋小球藻藻种(编号CCMA-410)由厦门大学海洋学院提供。

PGX多段光照培养箱, 宁波莱福科技有限公司; UV-2100紫外可见分光光度计, 北京莱伯

收稿日期: 2016-04-10 修回日期: 2017-01-15

资助项目: 福建省自然科学基金(2015J01615); 厦门市海洋经济发展专项(14GZP67NF31); 集美大学创新团队基金(2010A007)

通信作者: 黄志勇, E-mail: zhyhuang@jmu.edu.cn

泰科仪器有限公司; 7500a型电感耦合等离子质谱(ICP-MS), 美国安捷伦科技有限公司; 2-16型高速离心机, 德国Sigma公司。

1.2 实验方法

小球藻的培养 用灭菌海水配制培养基, 进行扩大培养。改进的f/2配方的培养基组成: NaHCO_3 0.93 g/L、 MgSO_4 0.40 g/L、 KNO_3 0.46 g/L、 K_2HPO_4 0.020 g/L、维生素 B_1 0.60 mg/L、维生素 B_{12} 1.8 $\mu\text{g/L}$ 、生物素2.0 $\mu\text{g/L}$ 。培养基pH 5.0, 盐度为40。将藻种和营养液以体积分数1:1的比例接种至三角瓶中, 在多段光照培养箱内进行扩大培养。设置的培养条件: 温度(25±1) °C, 光照强度2500 lx, 光暗比20 L/4 D。

小球藻生物量的测定 小球藻细胞密度采用光密度法测定^[9], 根据小球藻液吸光度与小球藻的密度存在对应关系间接测定小球藻的生物量^[10]。经实验, 小球藻细胞生物量(ρ)与吸光度值($A_{683 \text{ nm}}$)的线性关系为 $\rho=3.26A+0.0755$ ($r=0.9988$)。因此, 可通过在683 nm处测得藻液的吸光度值计算小球藻的生物量。

小球藻锌胁迫实验 当小球藻达到对数生长期(小球藻密度达到 3.3×10^7 个/mL)时, 分别加入含5、10、20、50和100 $\mu\text{mol/L}$ 锌离子浓度的氯化锌、乙酸锌、葡萄糖酸锌和柠檬酸锌进行胁迫培养, 每个浓度平行3份, 对照组为不添加锌盐的小球藻, 每天通过吸光度值($A_{683 \text{ nm}}$)定时检测各组的生物量, 绘制不同培养时间的小球藻生长曲线。

小球藻热稳定蛋白提取液中蛋白质含量的测定 在4 °C下6000 r/min离心15 min收集各组藻细胞, 所得藻细胞用10 mmol/L EDTA- Na_2 清洗2次, 再用超纯水清洗3次以去除藻细胞表面附着的锌离子。将洗涤后的藻泥悬浮于10 mmol/L的Tris-HCl缓冲液中, 然后进行超声波细胞破碎。将破碎后的样品置于75 °C恒温水浴锅中加热5 min, 以去除不稳定蛋白, 然后离心(12 000 r/min, 4 °C) 10 min以除去细胞碎片和未破碎的细胞, 所得上清液即为小球藻热稳定蛋白提取液。

采用考马斯亮蓝法^[11]分别测定小球藻在4种锌盐于不同浓度和不同时间(2、3、4、5 d)胁迫下提取液中热稳定蛋白含量。同时测定对照组小球藻提取液中热稳定蛋白质含量。

不同锌盐胁迫下小球藻Zn-MTs诱导量的测定用凝胶渗透色谱与电感耦合等离子体质谱(SEC-ICP-MS)联用法^[5、12]分别测定小球藻热稳定蛋白提取液中Zn-MTs含量。将提取液过0.45 μm 微孔滤膜, 注入SEC-ICP-MS联用系统中, 以10 mmol/L Tris-HCl(内含1 mmol/L的DTT, pH 7.8)为流动相, 在流速为1.0 mL/min下洗脱。洗脱液先经DAD检测(254 nm), 之后在线导入ICP-MS监测Zn信号, 记录流出组分中Zn的信号强度。以免肝金属硫蛋白标准为对照, 以Zn信号强度比较小球藻Zn-MTs的诱导量。

数据统计处理 单因素方差分析(One-Way ANOVA)和重复测量资料的双因素方差分析(Two-Way ANOVA)由SPSS 19.0软件完成, 多重比较采用LSD检验法和 q 检验法。其中 $P<0.01$ 表示组间的差异有高度统计学意义, $P<0.05$ 表示组间的差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同锌盐胁迫对小球藻生长的影响

与对照组相比, 低浓度(5~10 $\mu\text{mol/L}$)氯化锌对小球藻生长影响不大; 而当锌离子浓度增大到20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 小球藻的生长受到抑制($P<0.01$); 当锌离子浓度达到100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 小球藻生长受到严重抑制, 其生物量在第7天较最初下降了23.6%(图1-a)。柠檬酸锌对小球藻生长的影响规律与氯化锌相似, 但锌离子浓度大于10 $\mu\text{mol/L}$ 时即对小球藻的生长产生抑制, 且锌离子浓度越高, 抑制作用越明显(图1-d), 用100 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸锌胁迫7 d, 小球藻的生物量下降了15.6%。乙酸锌(图1-b)和葡萄糖酸锌(图1-c)在锌离子浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时即对小球藻的生长有显著抑制($P<0.05$), 且随着锌离子浓度增加抑制作用增强。总体上, 不同离子浓度的4种锌盐对小球藻胁迫4 d后均产生明显抑制作用, 且随着时间的延长, 抑制作用加强。例如, 以锌离子浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的锌盐胁迫小球藻4 d, 其单因素方差分析表明, 4种不同锌盐对小球藻的生长抑制无显著性差异($P>0.05$)。

4种锌盐对小球藻的生长抑制作用受其胁迫时间和浓度的共同影响。双因素方差分析结果显示: 锌盐的胁迫浓度、胁迫时间及二者的交互作用均对小球藻的生长有极显著的抑制作用($P<0.01$)(表1)。

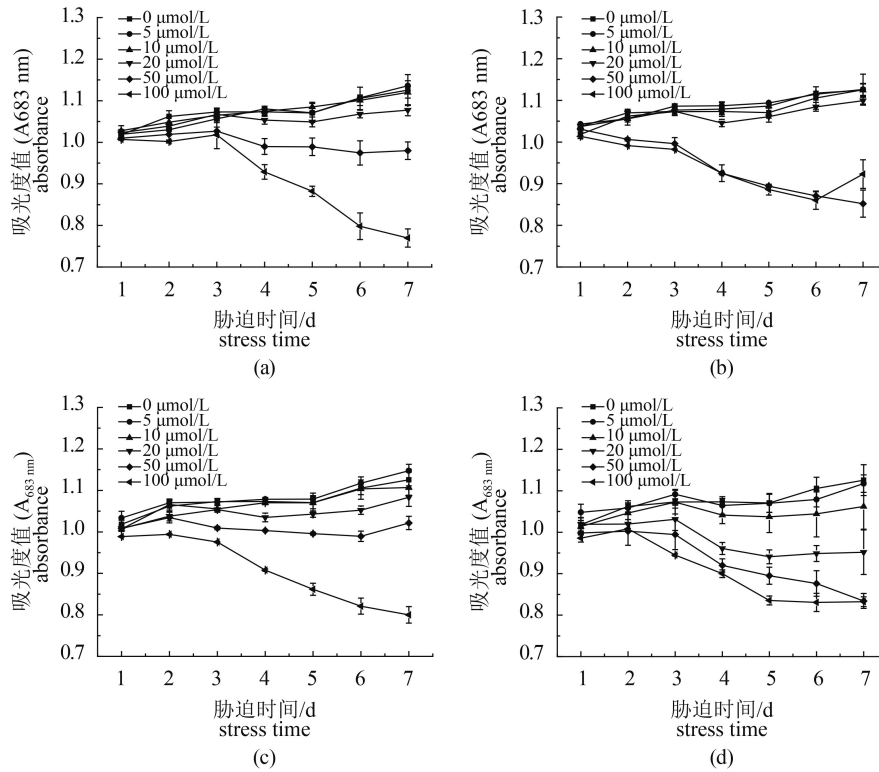


图 1 不同锌盐胁迫下小球藻的生长曲线

(a) 氯化锌; (b) 乙酸锌; (c) 葡萄糖酸锌; (d) 柠檬酸锌

Fig. 1 Growth curves of *Chlorella* sp. exposed to different zinc salts

(a) zinc chloride; (b) zinc acetate; (c) zinc gluconate; (d) zinc citrate

表 1 不同锌盐的胁迫浓度和时间对海洋小球藻生长影响的双因素方差分析结果

Tab. 1 Growths of *Chlorella* sp. exposed to different concentrations of zinc salts for different time estimated by Two-Way ANOVA

锌盐种类 species of zinc salts	影响因素 effect factors	F值 F-value	P值 P-value	显著性 significance
氯化锌 zinc chloride	胁迫浓度/($\mu\text{mol/L}$) stress concentrations	677.222	2.8×10^{-66}	**
	胁迫时间/d stress time	15.812	4.5×10^{-12}	**
	胁迫浓度 \times 胁迫时间 stress concentrations \times stress time	67.563	5.2×10^{-47}	**
乙酸锌 zinc acetate	胁迫浓度/($\mu\text{mol/L}$) stress concentrations	1069.368	1.9×10^{-74}	**
	胁迫时间/d stress time	24.813	1.0×10^{-16}	**
	胁迫浓度 \times 胁迫时间 stress concentrations \times stress time	65.474	1.8×10^{-46}	**
葡萄糖酸锌 zinc gluconate	胁迫浓度/($\mu\text{mol/L}$) stress concentrations	1161.138	6.3×10^{-76}	**
	胁迫时间/d stress time	39.404	2.0×10^{-21}	**
	胁迫浓度 \times 胁迫时间 stress concentrations \times stress time	73.691	1.6×10^{-48}	**
柠檬酸锌 zinc citrate	胁迫浓度/($\mu\text{mol/L}$) stress concentrations	374.859	7.3×10^{-56}	**
	胁迫时间/d stress time	35.517	4.5×10^{-21}	**
	胁迫浓度 \times 胁迫时间 stress concentrations \times stress time	20.082	4.7×10^{-27}	**

注: ** 差异极显著($P < 0.01$)

Notes: **. extremely significant difference($P < 0.01$)

2.2 不同锌盐胁迫对小球藻热稳定蛋白含量的影响

当小球藻处于对数生长期时, 分别加入20、50和100 μmol/L的锌盐, 胁迫培养后产生的热稳定蛋白。胁迫后的小球藻热稳定蛋白含量均极显著高于对照组($P<0.01$), 且热稳定蛋白含量与锌盐的种类、浓度和胁迫时间有关(图2)。多数锌盐浓度达到100 μmol/L时, 小球藻热稳定蛋白诱导受到抑制。

单因素方差分析结果显示, 离子浓度为50 μmol/L的4种锌盐在胁迫3 d后热蛋白含量相互呈极显著差异($P<0.01$), 含量依次为葡萄糖酸锌>柠檬酸锌>乙酸锌>氯化锌, 有机锌盐(葡萄糖酸锌、柠檬酸锌、乙酸锌)胁迫产生的热稳定蛋白极显著高于无机锌盐(氯化锌)胁迫的含量($P<0.01$),

其中以锌离子浓度为50 μmol/L的葡萄糖酸锌胁迫3 d产生的热稳定蛋白含量最高, 每g湿藻泥中热稳定蛋白含量达到34.5 mg, 是对照组的3.3倍。

2.3 不同锌盐胁迫对小球藻Zn-MTs诱导量的影响

不同锌盐胁迫3 d后的小球藻Zn-MTs含量如图3所示, 实验中4种锌盐在低浓度(20 μmol/L)胁迫下, 相应的小球藻细胞内Zn-MTs含量较低; 当锌离子浓度为50 μmol/L时, 细胞内Zn-MTs含量明显增加, 但继续提高锌离子浓度至100 μmol/L后, Zn-MTs含量并没有继续增加。由图3可知, 以锌离子浓度为50 μmol/L的4种不同锌盐胁迫3 d, 小球藻细胞内Zn-MTs的诱导量依次为葡萄糖酸锌>柠檬酸锌>氯化锌>乙酸锌, 其中以葡萄糖酸锌诱导产生的Zn-MTs量为最高。

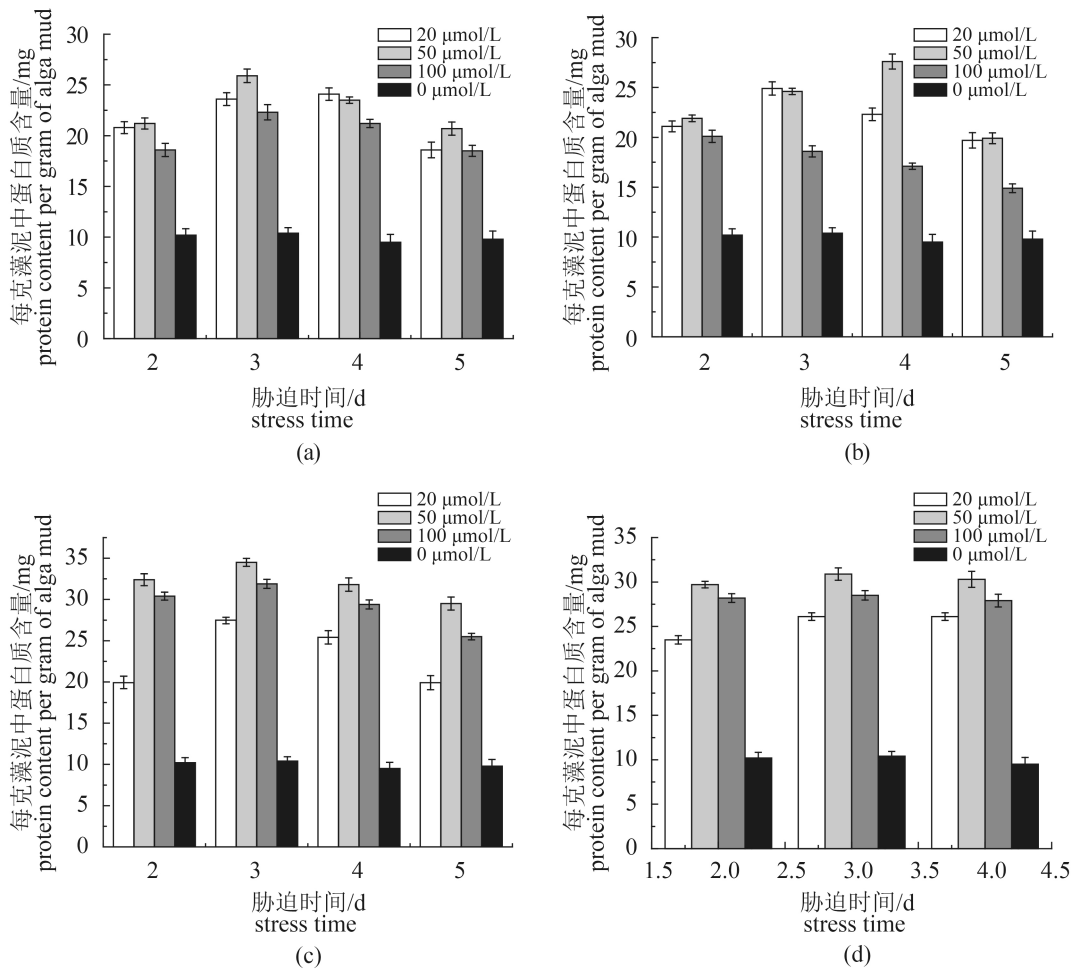


图2 不同锌盐胁迫对小球藻热稳定蛋白含量的影响

(a) 氯化锌; (b) 乙酸锌; (c) 葡萄糖酸锌; (d) 柠檬酸锌

Fig. 2 Effects of different zinc salts on the contents of heat-stable proteins in *Chlorella* sp.

(a) zinc chloride; (b) zinc acetate; (c) zinc gluconate; (d) zinc citrate

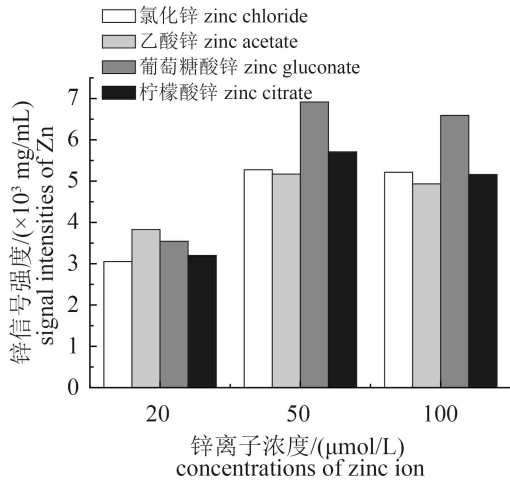


图3 不同锌盐胁迫3 d后的小球藻Zn-MTs含量

Fig. 3 Inductions of Zn-MTs in *Chlorella* sp. exposed to different zinc salts for 3 days

经SEC-ICP-MS进行检测,发现用锌离子浓度为50 μmol/L的葡萄糖酸锌胁迫3 d,小球藻诱导产生的Zn-MTs量达到最高。因此,可选择锌离子浓度为50 μmol/L的葡萄糖酸锌对小球藻进行胁迫培养以诱导产生Zn-MTs。

3 讨论

目前关于锌离子胁迫对小球藻生长影响的研究报道不一,例如李坤等^[13]报道0.308 mmol/L锌离子胁迫小球藻72 h就达到EC₅₀; Bilgrami等^[14]报道1.5 mmol/L的锌离子对小球藻生长几乎没有影响;而欧阳慧灵等^[15]则报道5 μmol/L锌胁迫2 d就有显著抑制。本实验的结果即锌离子浓度较低时,锌盐对小球藻生长影响较小,但随着锌离子浓度增大,对小球藻生长的抑制作用增强。4种锌盐胁迫4 d后,对小球藻生长均表现出明显的抑制作用,锌盐的胁迫浓度、胁迫时间及二者的交互作用均对小球藻的生长有极显著的抑制作用。此结果与上述报道也存在差异,这可能与培养基质的性质、光照强度、锌盐种类、初始生物量以及藻细胞种属等因素有关^[8]。

锌盐胁迫使小球藻细胞内热稳定蛋白含量显著增加,但热稳定蛋白含量的产生与锌盐的种类和胁迫浓度有关,有机锌盐(葡萄糖酸锌、柠檬酸锌、乙酸锌)胁迫产生的热稳定蛋白显著高于无机锌盐(氯化锌)胁迫的含量,其中以葡萄糖酸锌胁迫产生的热稳定蛋白含量为最高,锌

盐浓度对蛋白质合成具有“低促进高抑制”的现象,与文献^[16]基本一致。

小球藻Zn-MTs是一类与Zn按比例结合的蛋白^[17],因此可用锌信号值高低来反映小球藻Zn-MTs的含量^[18]。与未加锌盐胁迫的对照组相比,小球藻细胞内Zn-MTs含量很低。而经锌盐胁迫后,细胞内Zn-MTs含量增加。金属硫蛋白是一类富含半胱氨酸、对金属具有高度亲和性的金属结合蛋白,可在动植物和微生物中产生。而微藻在重金属胁迫下也可产生金属硫蛋白,其主要的作用是对抗环境的重金属胁迫,对机体自身产生解毒作用^[5, 19]。在未加锌盐胁迫的对照组中,小球藻细胞内Zn-MTs含量很低。而经锌盐胁迫后,细胞内Zn-MTs含量明显增加,但继续提高锌浓度至100 μmol/L后,Zn-MTs含量并没有继续增大。Silvestre等^[20]的研究发现,在一定浓度范围内,金属硫蛋白的表达量随金属浓度的升高而呈上升趋势,当金属浓度超过某一阈值,机体的生长代谢和参与MTs合成的酶的活性会被破坏,金属硫蛋白的诱导量就会降低,这一现象与本实验的结果一致。

通过考察不同锌盐在不同锌离子浓度下对小球藻生长和MTs诱导的影响,发现锌盐的种类、胁迫浓度和胁迫时间对小球藻生长、小球藻细胞内热稳定蛋白含量以及金属硫蛋白的诱导量均有影响,而选择锌离子浓度为50 μmol/L的葡萄糖酸锌对小球藻进行胁迫培养可诱导产生最高含量的Zn-MTs。

参考文献:

- [1] 张旗,尚小玉,王娜,等. 小球藻营养活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 139-143.
Zhang Q, Shang X Y, Wang N, et al. The research progress on nutrition activity of *Chlorella*[J]. Food Research and Development, 2015, 36(13): 139-143(in Chinese).
- [2] Yang H, Huang Z Y, Li J, et al. MT-like proteins: potential bio-indicators of *Chlorella vulgaris* for zinc contamination in water environment[J]. Ecological Indicators, 2014, 45(5): 103-109.
- [3] 李连平,张小东,黄志勇,等. 小球藻锌结合类金属硫蛋白的结构表征及抗菌活性[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 278-284.
Li L P, Zhang X D, Huang Z Y, et al. Studies on the

- structural characterization and antimicrobial activities of Zn-MT-like proteins induced from *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(2): 278-284(in Chinese).
- [4] 李连平, 黄志勇, 王志聪, 等. 小球藻锌结合金属硫蛋白(Zn-MT-like)的抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 23-27.
Li L P, Huang Z Y, Wang Z C, *et al.* Study on anti-oxidation activity of Zn-MT-like induced from *C. Vulgaris*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(4): 23-27(in Chinese).
- [5] 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]. Aquatic Toxicology, 2009, 91(1): 54-61.
- [6] 李连平, 梁英, 黄志勇, 等. 小球藻锌结合类金属硫蛋白的提取和分离[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(6): 188-192.
Li L P, Liang Y, Huang Z Y, *et al.* Extraction and separation of Zn-MT-like induced from *C. Vulgaris* under the stress of ZnCl₂[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(6): 188-192(in Chinese).
- [7] 王文君, 吕娜, 尹锐, 等. 金属硫蛋白研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 13-16.
Wang W J, Lü N, Yin R, *et al.* Research progress of metallothionein[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(1): 13-16(in Chinese).
- [8] 杨洪, 黄志勇. 锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(22): 7117-7123.
Yang H, Huang Z Y. Activities of antioxidant enzymes and Zn-MT-like proteins induced in *Chlorella vulgaris* exposed to Zn²⁺[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(22): 7117-7123(in Chinese).
- [9] 刘学铭, 余若黔, 梁世中. 分批异养培养小球藻光密度值与干重的关系[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 339-341.
Liu X M, Yu R Q, Liang S Z. The relationship between optical density and dry weight of *Chlorella vulgaris* in batch heterotrophic culture[J]. Microbiology, 1999, 26(5): 339-341(in Chinese).
- [10] 沈萍萍, 王朝晖, 齐雨藻, 等. 光密度法测定微藻生物量[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2001, 22(3): 115-119.
Shen P P, Wang Z H, Qi Y Z, *et al.* An optical density method for determination of microalgal biomass[J]. Journal of Jinan University (Natural Science Edition), 2001, 22(3): 115-119(in Chinese).
- [11] 邓丽莉, 潘晓倩, 生吉萍, 等. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 185-189.
Deng L L, Pan X Q, Sheng J P, *et al.* Optimization of experimental conditions for the determination of water soluble protein in apple pulp using Coomassie Brilliant Blue Method[J]. Food Science, 2012, 33(24): 185-189(in Chinese).
- [12] Huang Z Y, Shen J C, Zhuang Z X, *et al.* Investigation of metal-binding metallothioneins in the tissues of rats after oral intake of cinnabar[J]. Analytical and Bio-analytical Chemistry, 2004, 379(3): 427-432.
- [13] 李坤, 李琳, 侯和胜, 等. Cu²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺对两种单胞藻的毒害作用[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 395-398.
Li K, Li L, Hou H S, *et al.* Study on toxicity of heavy metal ions to two species of marine unicellular algae[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2002, 8(4): 395-398(in Chinese).
- [14] Bilgrami K S, Kumar S. Effects of copper, lead and zinc on phytoplankton growth[J]. Biologia Plantarum, 1997, 39(2): 315-317.
- [15] 欧阳慧灵, 孔祥臻, 秦宁, 等. 5种重金属亚致死暴露浓度对普通小球藻生长抑制与光合毒性的比较[J]. 科学通报, 2012, 57(25): 3363-3370.
Ouyang H L, Kong X Z, Qin N, *et al.* Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(25): 3363-3370.
- [16] 徐勤松, 施国新, 王学, 等. 镉、铜和锌胁迫下黑藻活性氧的产生及抗氧化酶活性的变化研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(1): 107-112.
Xu Q S, Shi G X, Wang X, *et al.* Generation of active oxygen and change of antioxidant enzyme activity in *Hydrilla verticillata* under Cd, Cu and Zn stress[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(1): 107-112(in Chinese).
- [17] 常团结, 朱祯. 植物金属硫蛋白研究进展(一)—植物MT的分类、特征及其基因结构[J]. 生物技术通报, 2002(3): 5-10.
Chang T J, Zhu Z. Study advances of plant metal-

- lothionein—classification, characteristics and gene structure[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2002(3): 5-10(in Chinese).
- [18] 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.
- Guo X X, Chen Z J, Dan C T, *et al.* Purification and characterization of metallothionein-like protein in *Synechococcus* sp. PCC 7942[J]. *Chinese Biochemical Journal*, 1997, 13(6): 699-703(in Chinese).
- [19] Yoshida N, Ishii K, Okuno T, *et al.* Purification and characterization of cadmium-binding protein from unicellular alga *Chlorella sorokinian*[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(6): 460-463.
- [20] Silvestre F, Duchêne C, Trausch G, *et al.* Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(1): 39-45.

Growth exhibition and metallothioneins induction of *Chlorella* sp. exposed to different zinc salts

PENG Aihong, GAO Shuang, CHEN Jun, ZHUANG Meizhen, WANG Fan, CHEN Xiaomei, LIN Zhengzhong, HUANG Zhiyong*

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The exhibition of growth and the induction of metallothioneins of *Chlorella* sp. exposed to different kinds of zinc salts were investigated. The biomass, heat-stable proteins and Zn-MTs were measured when the *Chlorella* sp. were exposed to four kinds of Zn²⁺ (including zinc chloride, zinc acetate, zinc gluconate, zinc citrate) at the concentrations of 5, 10, 20, 50 and 100 μmol/L. Results showed that the growth of *Chlorella* sp. was not significantly inhibited when the zinc concentrations were less than 5 and 10 μmol/L for zinc citrate and zinc chloride, respectively. But the growth was significantly inhibited at the concentrations of 5 μmol/L for each of zinc acetate and zinc gluconate, and the algal biomass rapidly decreased with the increases of Zn²⁺ concentrations for the two zinc salts. The results also showed that the amounts of heat-stable proteins significantly increased in *Chlorella* sp. exposed to the four kinds of zinc salts compared with that of the control group (without adding any zinc salt), and the largest amount of heat-stable proteins was obtained when the algae were exposed to zinc gluconate at 50 μmol/L for 3 days, producing 34.5 mg of heat-stable proteins per gram of wet algae mud, which was 3.3 times higher than that of the control group. And the largest amount of Zn-MTs was induced under the inducing condition.

Key words: *Chlorella* sp.; zinc stress; zinc gluconate; biomass; metallothioneins

Corresponding author: HUANG Zhiyong. E-mail: zhyhuang@jmu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of Fujian Province of China (2015J01615); Special Project of Xiamen Marine Economy Development of China (14GZP67NF31); Foundation for Innovative Research Team of Jimei University (2010A007)