

研究论文

氮胁迫下小球藻淀粉与脂肪的合成关系

王亚杰^{1,2}, 朱顺妮¹, 王忠铭¹, 袁振宏¹

(¹中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室, 广东 广州 510640;

²中国科学院大学, 北京 100039)

摘要: 绿藻特别是小球藻细胞存在两大储碳代谢物, 脂肪 (TAG) 和淀粉, 且二者的合成享有共同的前体物质。本实验以小球藻 *Chlorella* sp. 为研究对象, 在氮胁迫的条件下, 抑制淀粉合成途径的关键酶和脂肪合成途径的关键酶, 通过对比淀粉及脂肪的积累情况来探究两条代谢途径之间的关系。实验结果显示: 加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pi 明显抑制了淀粉合成途径, 导致淀粉含量降低, 脂肪酸浓度有所增加, 单位细胞脂肪酸无显著影响。加入 $40 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀禾定在第 6 d 表现出对脂肪的抑制, 淀粉浓度降低, 单位细胞淀粉含量并无显著影响。

关键词: 小球藻; 氮缺乏; 淀粉; 脂肪酸; 抑制剂; 生物燃料; 代谢; 生物技术

DOI: 10.11949/j.issn.0438-1157.20141760

中图分类号: Q 93; TK 6

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2015) 06—2189—07

Synthesis pathway relationship between starch and fat in *Chlorella* sp. under nitrogen starvation

WANG Yajie^{1,2}, ZHU Shunni¹, WANG Zhongming¹, YUAN Zhenhong¹

(¹Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China; ²University of Chinese Academic of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Triacylglycerol (TAG) and starch, as the two main energy storage products in green microalgae, especially the *Chlorella* sp., share the same synthesis precursor in its metabolism system. This research aimed at the key enzymes in inhibiting starch and TAG synthesis, using *Chlorella* sp. as the object under nitrogen starvation. To investigate the relationship between the two metabolism pathways, comparison of TAG and starch accumulation was conducted. The starch synthesis way was significantly inhibited when $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pi was added, resulting in reduced starch content and increased fatty acids concentration. While, fatty acids content per cell unit was not obviously influenced. In addition, $40 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of sethoxydim also showed starch inhibition after it had been introduced for 6 days. In this situation, starch concentration was reduced but unit cell starch content was not significantly changed.

Key words: *Chlorella* sp.; nitrogen starvation; starch; fatty acids; inhibition; biofuel; metabolism; biotechnology

引 言

近年来微藻作为生物燃料已成为当下的研究

热点。脂肪和淀粉是微藻细胞中两种重要的储能物质^[1-2]。研究表明: 在环境胁迫时, 如缺氮、高光、高盐的情况下, 微藻细胞进行储能, 促进这些物质

2014-11-30 收到初稿, 2015-03-02 收到修改稿。

联系人: 袁振宏。第一作者: 王亚杰 (1988—), 女, 硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100189); 国家科技支撑计划项目 (2011BAD14B03); 国家高技术研究发展计划项目 (2013AA065803)。

Received date: 2014-11-30.

Corresponding author: Prof. YUAN Zhenhong, yuanzh@ms.giec.ac.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (31100189), the National Key Technology Research and Development Program of China (2011BAD14B03) and the National High Technology Research and Development Program of China (2013AA065803).

合成^[3]。

微藻中脂肪和淀粉的合成途径如图 1 所示, 二氧化碳经过卡尔文循环产生 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-P), 在淀粉合成途径中, 3-磷酸甘油醛再进一步转化为葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-P) 和葡萄糖-1-磷酸 (glucose-1-P)。之后由关键酶 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 催化转化成 ADP-葡萄糖, 再经过一系列反应催化成淀粉^[4]。在脂肪合成途径中, 3-磷酸甘油醛通过糖酵解途径生成丙酮酸 (pyruvate), 之后被第一个关键限速酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase) 催化生成丙二酰辅酶 A, 再经过一系列反应最终合成脂肪^[5-7]。

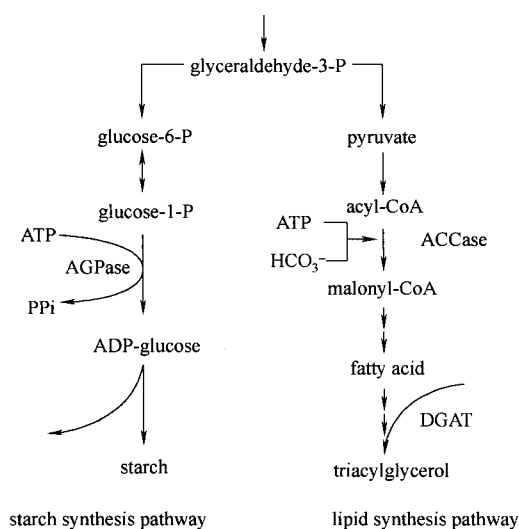


图 1 脂肪和淀粉合成途径

Fig. 1 Lipid and starch synthesis pathway

由此可见, 微藻中淀粉的合成与脂肪的合成拥有共同的前体物质 3-磷酸甘油醛, 有可能存在一定的竞争关系。已有研究表明^[8-9]在植物中淀粉和脂肪的合成途径存在相互关系, 但它们之间的调控机制还不清楚。如油菜胚胎的淀粉合成受到抑制会导致脂肪的合成速率减慢, 最终成熟种子中的总脂肪含量没有明显改变^[9]。然而通过失活淀粉分支酶导致不产淀粉的豌豆 *Pisum sativum* 突变体却可以显著提高种子的脂肪含量。在微藻中, 这方面的研究较缺乏, 且主要集中在模式生物 *Chlamydomonas reinhardtii*。Wang 等^[10]和 Li 等^[11]分别报道了不产淀粉的突变藻株 *C. reinhardtii* BAFJ5 在缺氮后含油量比野生型有明显增加。这些研究表明淀粉和脂肪合成之间可能存在竞争。

前期研究发现, 在胁迫条件下小球藻 *Chlorella* sp. 快速积累淀粉作为短期应急响应, 而随着氮胁迫

时间的延长, 小球藻转而积累能量密度更高的脂肪作为长期储能物质^[1-2], 但是这两者的关系还不清楚。因此本文在前期研究的基础上, 在氮胁迫的条件下分别添加淀粉合成途径关键酶 AGPase 的抑制剂 Pi (无机磷酸盐)^[12-13]或脂肪合成途径关键酶 ACCase 的特异性抑制剂稀禾定^[14], 原位解析小球藻淀粉和脂肪之间的相互关系。研究结果可以为调控微藻脂肪和淀粉合成提供理论指导^[15], 对微藻生物燃料的开发和应用有着至关重要的意义。

1 材料与实验方法

1.1 藻种与培养条件

小球藻 *Chlorella* sp. 保存在 BG-11 培养基中。反应器采用柱状玻璃管 (装液量为 1 L), 培养温度约 25 °C, 24 h 连续光照, 光照强度为 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 在反应器底部持续通入富加 CO₂ (1%, 体积比) 的压缩空气。

1.2 实验设计

1.2.1 淀粉合成的抑制实验 将种子液在 BG-11 培养基中通气培养 4 d 至对数生长期后, 分别接种至对照组 (缺氮培养基) 和实验组 (缺氮培养基加入 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pi) 中, 初始 OD₇₅₀ 约为 0.8, 每组实验设 3 个平行, 连续培养 6 d, 第 0、1、2、4、6 d 取样。

1.2.2 脂肪合成的抑制实验 将种子液在 BG-11 培养基中通气培养 4 d 至对数生长期后, 分别接种至对照组 (缺氮培养基) 和实验组 (缺氮培养基加 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀禾定) 中, 初始 OD₇₅₀ 约为 0.8, 每组实验设 3 个平行, 在气升光反应器中通入富加 CO₂ 的压缩空气 (1% CO₂), 培养温度 24 °C, 24 h 连续光照, 光照强度为 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。连续培养 6 d, 第 0、1、2、4、6 d 取样。

1.3 细胞生长测定

在实验周期内, 测定指定天数的藻细胞干重、细胞计数。

藻细胞干重: 取 10 ml 藻液抽滤, 于 80 °C 烘箱烘至恒重, 冷却后称重。

细胞计数: 取少量样品, 加至血球计数板, 在光学显微镜下读取 25 个 4×4 格中的细胞个数, 进行计算, 以 10⁷ cells · ml⁻¹ 为单位计数。

1.4 淀粉的测定

称取 2~4 mg 藻粉, 装入 10 ml 玻璃离心管中, 向玻璃离心管中加入 0.25 ml 超纯水和约 0.5 ml 的酸洗玻璃珠, 在 2700 r · min⁻¹ 下涡旋 4 min, 进行

破壁。加入 4 ml 浓度为 80%乙醇溶液和转子(直径 10 mm), 于 68℃水浴 15 min。水浴后 4000 r·min⁻¹离心 6 min 去上清, 去除色素, 重复 3 次。加入 3.3 ml 30%高氯酸溶液, 在 25℃下搅拌 15 min。搅拌后 4000 r·min⁻¹离心 6 min, 取上清装入 10 ml 容量瓶中, 淀粉充分水解, 重复 3 次。定容至 10 ml^[16]。采用苯酚-硫酸法测定淀粉含量^[17]。

1.5 脂肪的测定

本研究使用一步提取+酯交换反应^[18]来进行微藻中脂质转化为 FAMES, 并结合气相色谱对 FAME 进行定量。具体方法如下。

藻粉中加入 2.5 ml 含 2%硫酸的甲醇溶液, 80℃下搅拌加热 2.5 h 完成脂肪酸的甲酯化。样品冷却至室温后加入 1 ml 饱和 NaCl 溶液和 1 ml 正己烷, 振荡后静置分层, 通过无水硫酸钠过滤, 加入正十七烷酸甲酯作为内标, 定容 1 ml。脂肪酸甲酯利用岛津 GC2010 气相色谱进行定量分析, 检测器为 FID。升温程序为: 190℃保持 5 min, 以 10℃·min⁻¹升温至 250℃, 再保持 7 min。色谱柱为: DB-WAX, 厚度 0.25 μm, 长度 30 m, 内径 0.25 μm。

脂肪酸甲酯标样为购自 Sigma 公司正十七烷酸甲酯。

2 结果与讨论

2.1 淀粉途径被抑制

2.1.1 Pi 对细胞生长的影响 小球藻 *Chlorella sp.* 在不同培养条件下的生长曲线如图 2 所示。小球藻 *Chlorella sp.* 初始浓度为 0.21 g·L⁻¹, 在对照组缺氮培养下, 到第 4 d 时生物量达到 0.70 g·L⁻¹, 之后增长放缓, 第 6 d 生物量达到 0.80 g·L⁻¹, 生物量总共增长了 4 倍。实验组缺氮加 Pi 条件培养下, 第 4 d 时生物量可达到 0.75 g·L⁻¹, 之后增长放缓, 第 6 d 生物量达到 0.82 g·L⁻¹, 生物量总共增长了 4.1 倍, 生物量相比对照组变化不明显, 但总体生长趋势较对照组好。对照组细胞个数接种时为 1.56(10⁷cells)·ml⁻¹, 第 2 d 达到 4.77(10⁷cells)·ml⁻¹, 之后增长缓慢甚至略有下降, 第 6 d 为 5.49(10⁷cells)·ml⁻¹。实验组在第 2 d 达到 4.90(10⁷cells)·ml⁻¹, 之后增长缓慢甚至略有下降, 第 6 d 为 5.91(10⁷cells)·ml⁻¹。细胞个数在第 2 d 后缓慢增长甚至略有下降, 较对照组而言 5 mmol·L⁻¹ Pi 可促进细胞的生长, 这与 Xie 等^[19]、Vezie 等^[20]的研究报道相一致。

2.1.2 Pi 对淀粉合成的影响 小球藻 *Chlorella sp.*

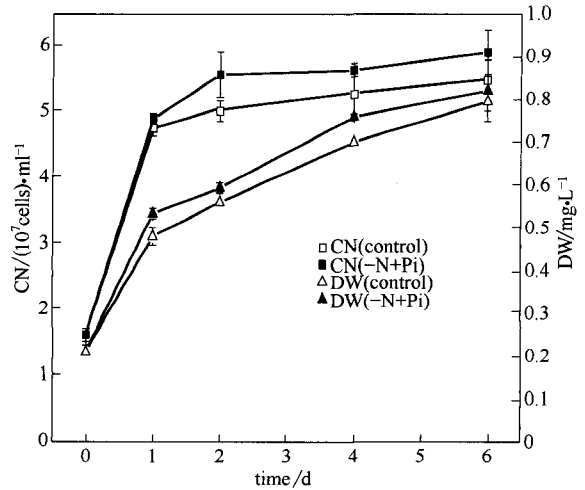


图2 小球藻在对照组和添加 Pi 抑制剂条件下生物量及细胞个数曲线

Fig.2 Curves of dry weight(DW), cell number (CN) in *Chlorella sp.* under control and (-N+Pi) conditions

在对照和缺氮加 Pi 条件下淀粉浓度和单位细胞淀粉含量随时间的变化如图 3 所示。在对照组, 淀粉浓度在第 1 d 迅速升高, 从初始的 30 mg·L⁻¹ 达到 154 mg·L⁻¹。第 2 d 有一个小的增幅达 178 mg·L⁻¹, 之后开始略微下降到第 6 d 达 154 mg·L⁻¹。对比加 Pi 组, 淀粉浓度在第 1 d 也是迅速升高到 162 mg·L⁻¹。第 2 d 略有升高之后开始缓慢下降, 第 6 d 达到 138 mg·L⁻¹[图 3(a)]。对照单位细胞淀粉含量第 1 d 从 19.4 μg·(10⁷cells)⁻¹ 达到 32.3 μg·(10⁷cells)⁻¹, 第 2 d 略微增加然后开始下降, 到第 6 d 达到 27.8 μg·(10⁷cells)⁻¹。实验组单位细胞淀粉含量第 1 d 迅速增至 33 μg·(10⁷cells)⁻¹, 第 2 d 略微增加然后开始下降, 到第 6 d 达到 22.7 μg·(10⁷cells)⁻¹ [图 3(b)]。

对比 *Chlorella sp.* 在两种条件下的变化, 加入 Pi 以后, 在前 2 d 淀粉浓度变化不明显, 淀粉浓度在第 2、4、6 d 分别降低了 3%、19%、9%。单位细胞淀粉含量在 2、4、6 d 分别降低了 13%、25%、18%。Lloyd 等^[21]发现在马铃薯接种 AGPase 可分别与 3-磷酸甘油酸 (3-PGA) 和无机磷 (Pi) 结合, 实现对 AGPase 的活性的调控, 3-PGA 是该酶激活因子, 后者是抑制因子, 能够抑制淀粉合成。Li 等^[12]的研究结果表明 1 mmol·L⁻¹ Pi 即可对 *Pseudochlorococcum sp.* 的 AGPase 酶活性产生显著影响, 能明显抑制淀粉的合成。

2.1.3 Pi 对脂肪合成的影响 小球藻 *Chlorella sp.* 在对照和缺氮加 Pi 条件下脂肪酸浓度和单位细胞脂肪酸含量随时间的变化如图 4 所示。对照条件下, 脂肪酸浓度呈现一直增长的趋势, 在对照组, 脂肪

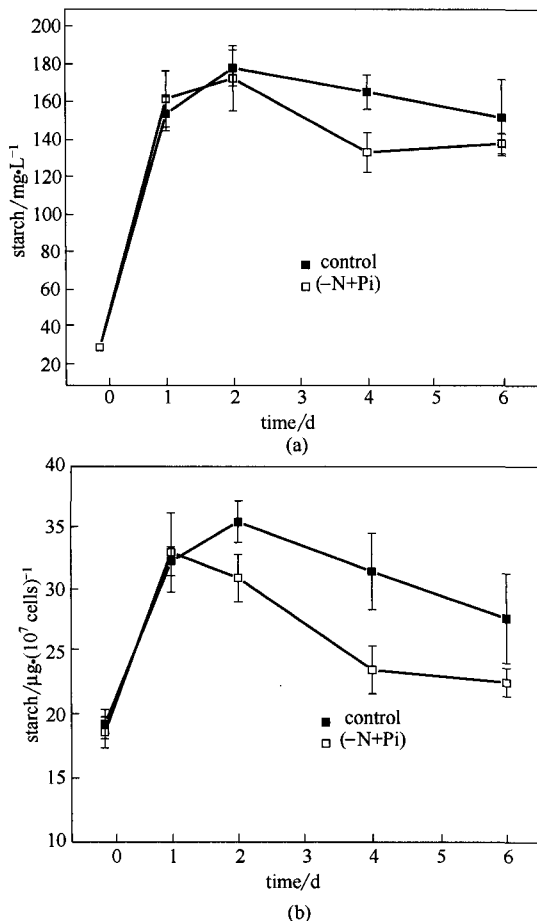


图 3 小球藻在对照条件和加抑制剂(-N+Pi)条件下淀粉浓度 (a) 和单位细胞淀粉含量 (b) 的变化

Fig. 3 Variations of starch in cultures *Chlorella* sp. under control and (-N+Pi) conditions

酸浓度从初始 28 mg · L⁻¹ 到第 6 d 达到 191 mg · L⁻¹。实验组脂肪酸浓度在第 6 d 达到 197 mg · L⁻¹ [图 4(a)]。对照组单位细胞脂肪酸含量从初始的 18.2 μg · (10⁷ cells)⁻¹ 达到 34.9 μg · (10⁷ cells)⁻¹。加了抑制剂 Pi 的实验组, 单位细胞脂肪酸含量在第 6 d 达到 32.4 μg · (10⁷ cells)⁻¹ [图 4(b)]。

对比 *Chlorella* sp. 在两种条件下的淀粉和脂肪酸含量变化, 表明在本实验期(6 d) Pi 抑制淀粉合成的同时并没有同时促进脂肪的积累。Siaut 等^[22]对 *Chlamydomonas reinhardtii* 的研究结果表明, 不产淀粉的突变藻株 CW15 sta1-2 等在缺氮后 TAG 含量较野生型并没有明显增加, 反而降低了。Li 等^[12]对 *Pseudochlorococcum* sp. 的研究表明, 加入 1 mmol · L⁻¹ 的 Pi 后 AGPase 酶活性第 2 d 降低了 39.2%, 对淀粉的合成有明显的抑制作用, 同时也导致脂肪含量的降低。但是 *Chlorella pyrenoidosa* 82T 通过紫外诱变获得的不产淀粉的突变株, 在缺

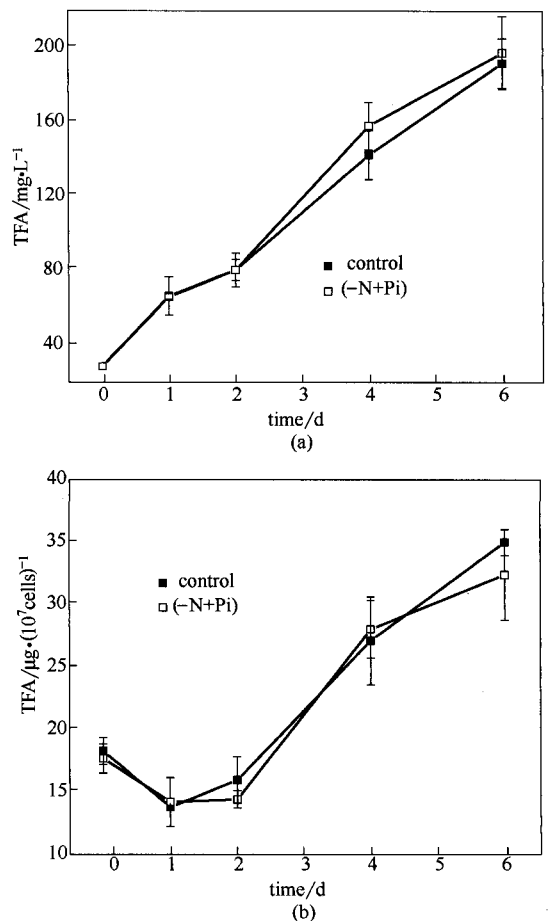


图 4 小球藻在对照和添加抑制剂(-N+Pi)条件下脂肪酸浓度 (a) 和单位细胞脂肪酸含量 (b) 的变化

Fig. 4 Variations of total fatty acids (TFA) in cultures *Chlorella* sp. under control and (-N+Pi) conditions

氮条件下积累脂肪酸的含量明显高于野生型^[23]。要想更准确地解析抑制淀粉途径对脂肪酸途径的影响, 还需要进一步的实验来验证。

2.2 脂肪途径被抑制

2.2.1 稀禾定对细胞生长的影响 小球藻 *Chlorella* sp. 在缺氮和缺氮加稀禾定 (sethoxydim) 对比条件下的生长曲线如图 5 所示。小球藻 *Chlorella* sp. 初始浓度为 0.19 g · L⁻¹, 在对照组, 细胞个数和生物量的长势与图 1 中的对照组一致。而在加稀禾定的实验组条件下, 生物量到第 4 d 时已达到 0.7 g · L⁻¹, 之后增长放缓, 第 6 d 生物量达到 0.74 g · L⁻¹, 生物量较对照组没有显著变化。说明 40 μmol · L⁻¹ 的稀禾定对细胞生物量的积累影响不大。细胞个数在第 2 d 后就一直低于对照组, 到培养的第 6 d 较对照组降低了 7.3%。结果显示, 加入稀禾定在一定程度上抑制了细胞个数的增长, 而对生物量的影响较小。Zhekisheva 等^[24]对 *Heamatococcus phuvialis* 的研究

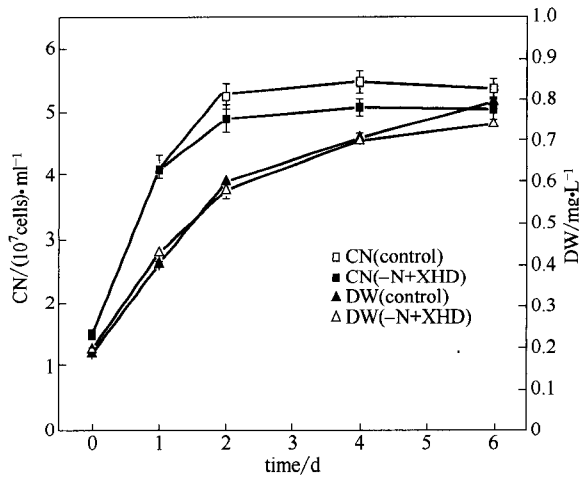


图 5 小球藻在对照组和添加稀禾定抑制剂条件下生物量及细胞个数曲线

Fig.5 Curves of dry weight(DW), cell number(CN) in *Chlorella* sp. under control and (-N+XHD) conditions

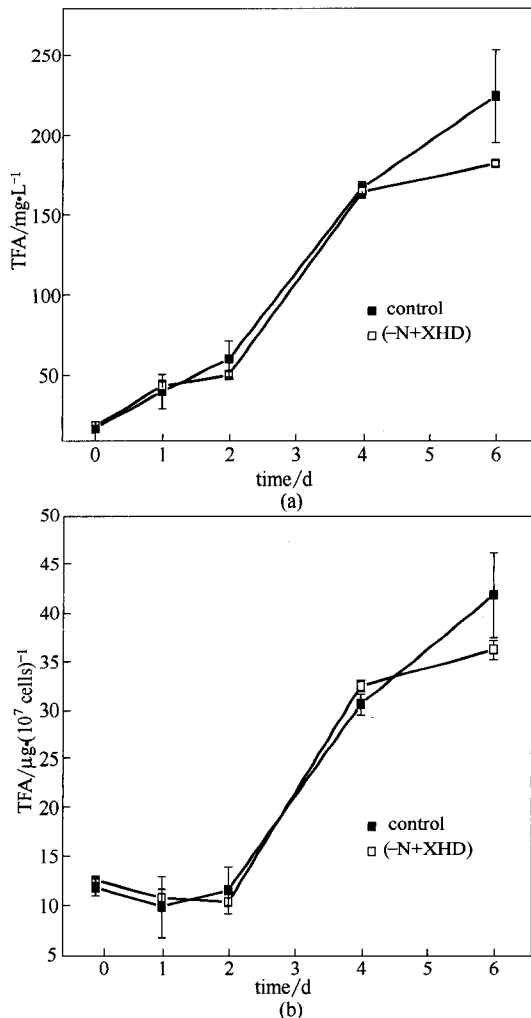


图 6 小球藻在对照和添加抑制剂稀禾定条件下脂肪酸浓度 (a) 和单位细胞脂肪酸含量 (b) 的变化

Fig. 6 Variations of total fatty acids (TFA) in cultures *Chlorella* sp. under control and (-N+XHD) conditions

结果发现 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀禾定对微藻细胞的生长无显著影响。

2.2.2 稀禾定对脂肪合成的影响 有研究表明, 稀禾定直接作用位点是 ACCase 的羧基转移酶(CT)功能域^[25]。ACCase 是脂肪酸合成途径的关键酶, 可以作为稀禾定的靶标位点^[14,26]。所以, 稀禾定能在一定程度上抑制脂肪酸的合成。加入稀禾定后脂肪酸含量的变化趋势如图 6 所示。前 4 d 与对照组相比无明显变化, 第 6 d 相对对照组脂肪酸浓度降低了 18.8%, 单位细胞的脂肪酸含量降低了 13.4%。由于缺氮条件下脂肪合成速率较慢^[1], 稀禾定对脂肪酸合成的抑制到后期才表现出来。本实验的结果表明, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的稀禾定能够在一定程度上抑制脂肪的合成。Zhekisheva 等^[24]对 *Heamatococcus pluvisialis* 加入 $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀禾定的研究结果显示稀禾定能够很好地抑制脂肪酸的合成, 尤其是中性脂 (NL) 的合成。

2.2.3 稀禾定对淀粉合成的影响 小球藻 *Chlorella* sp. 在加入稀禾定的培养基中培养, 淀粉合成的变化趋势如图 7 所示。与对照组相比淀粉合成趋势相同,

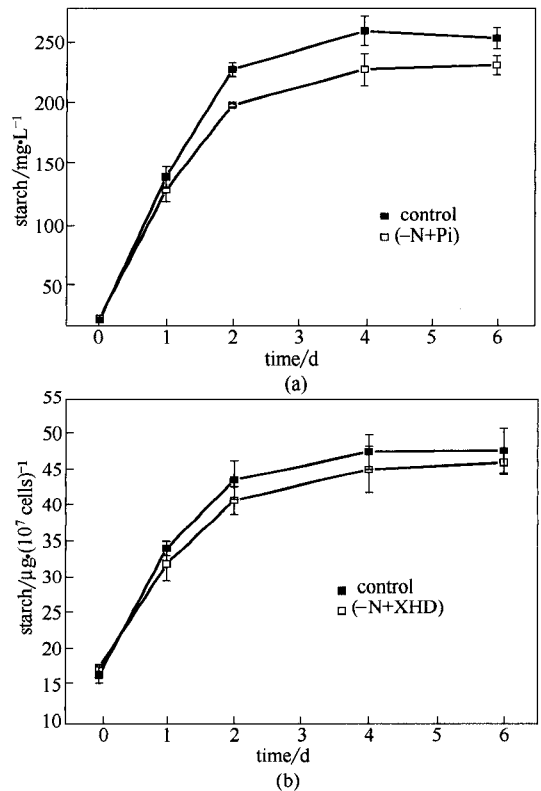


图 7 小球藻在对照和添加稀禾定抑制剂条件下淀粉浓度 (a) 和单位细胞淀粉含量 (b) 的变化

Fig. 7 Variations of starch in cultures *Chlorella* sp. under control and (-N+ XHD) conditions

都是前 2 d 增长迅速,第 2 d 以后缓慢增长甚至略有下降。对照组第 2 d 淀粉浓度和单位细胞淀粉含量分别是 $229 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $43 \text{ } \mu\text{g} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$ 。加入稀禾定的实验组,第 2 d 淀粉浓度和单位细胞淀粉含量分别是 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $41 \text{ } \mu\text{g} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$ 。

本实验的结果表明,抑制脂肪途径对淀粉无明显作用,可能因为淀粉是快速积累的产物,脂肪是一个长期缓慢积累的产物。这与 Recht 等^[18]对 *Haematococcus pluvialis* 的研究结果相似,他们用苹果酸脱氢酶特异性抑制剂芝麻酚成功抑制了脂肪酸的合成,总糖浓度也略有降低,碳水化合物含量(占干重的百分比)并没有显著影响。

3 结 论

(1) 缺氮条件下加入 Pi 能在一定程度上促进小球藻的生长,对淀粉的合成具有明显的抑制效应,脂肪酸浓度有所增长,但对单位细胞脂肪酸含量的促进效应不是很明显。

(2) 缺氮条件下加入稀禾定对小球藻细胞的生长有一定的抑制作用,对脂肪酸的合成只在第 6 d 开始受到明显抑制,淀粉浓度降低,但单位细胞淀粉含量无显著影响,可能是由于稀禾定抑制了细胞的生长导致的。

(3) 小球藻淀粉和脂肪的合成可能并不是简单的竞争关系,抑制一方的合成似乎并不能促进另一方合成的增强,需要更进一步的研究。

References

- [1] Huang Wei(黄伟), Zhu Shunni(朱顺妮), Wang Zhongming(王忠铭), Xu Jin(许瑾), Yuan Zhenhong(袁振宏). Synthesis patterns of carbohydrate and fatty acid under nitrogen starvation in the microalgae *Chlorella zofingiensis* [J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*(太阳能学报), 2014, **35** (12): 2559-2564.
- [2] Zhu Shunni, Huang Wei, Xu Jin, Wang Zhongming, Yuan Zhenhong. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalgae *Chlorella zofingiensis* [J]. *Bioresour. Technology*, 2014, **152**: 292-298.
- [3] Cakmak T, Angun P, Demiray Y E, Ozkan A D, Elibol Z, Tekinay T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, **109**(8): 1947-1957.
- [4] Ball S G, Morell M K. From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, **54**: 207-233.
- [5] Radakovits R, Jinkerson R E, Darzins A, Posewitz M C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, **9**(4): 486-501.
- [6] Greenwell H C, Laurens L M L, Shields R J, Lovitt R W, Flynn K J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, **7**(46): 703-726.
- [7] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *Plant J.*, 2008, **54**(4): 621-639.
- [8] Ruuska S A, Girke T, Benning C, Ohlrogge J. Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(6): 1191-1206.
- [9] Vigeolas H, Mohlmann T, Martini N, Neuhaus H E, Geigenberger P. Embryo specific reduction of ADP-Glc pyrophosphorylase leads to an inhibition of starch synthesis and a delay in oil accumulation in developing seeds of oilseed rape [J]. *Plant Physiol*, 2004, **136**(1): 2676-2686.
- [10] Wang Z T, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S, Goodenough U. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2009, **8**(12): 1856-1868.
- [11] Li Y, Han D X, Hu G R, Sommerfeld M, Hu Q A. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, **107**(2): 258-268.
- [12] Li Y T, Han D, Sommerfeld M, Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalgae *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions [J]. *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**(1): 123-129.
- [13] Neuhaus H E, Stitt M. Control analysis of photosynthate partitioning impact of reduced activity of adp-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh [J]. *Planta*, 1990, **182**(3): 445-454.
- [14] Harwood J. Graminicides which inhibit lipid synthesis [J]. *Pestic. Outlook*, 1999, **10**: 154.
- [15] Zhu Shunni(朱顺妮), Wang Zhongming(王忠铭), Shang Changhua(尚常花), Zhou Weizheng(周卫征), Yang Kang(杨康), Yuan Zhenhong(袁振宏). Lipid biosynthesis and metabolic regulation in microalgae [J]. *Progress in Chemistry*(化学进展), 2011, **10**: 2169-2176.
- [16] Branyikova I, Marsalkova B, Doucha J, Branyik T, Bisova K, Zachleder V, Vitova M. Microalgae novel highly efficient starch producers [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, **108**(4): 766-776.
- [17] Gilles K A, Dubois M, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**(3): 350-356.
- [18] Recht L, Zarka A, Boussiba S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, **94**(6): 1495-1503.
- [19] Xie L Q, Xie P, Li S X, Tang H J, Liu H. The low TN : TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms [J]. *Water Research*, 2003, **37**(9): 2073-2080.
- [20] Rapala J, Vezie C, Vaitomaa J. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strain and on intracellular microcystin concentrations [J]. *Microbial Ecology*, 2002, **10**: 443-454.
- [21] Lloyd J R, Springer F, Buleon A, Muller-Rober B, Willmitzer L,

- Kossmann J. The influence of alterations in ADP-glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers [J]. *Planta*, 1999, **209**(2): 230-238.
- [22] Cuine S, Siaut M, Cagnon C. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves [J]. *BMC Biotechnol.*, 2011, **11**: 7.
- [23] Ramazanov A, Ramazanov Z. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content [J]. *Phycological Research*, 2006, **54**(4): 255-259.
- [24] Zhekisheva M, Zarka A, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 2005, **41**(4): 819-826.
- [25] Yang Xueying (杨雪莹). The research of different Herbicides' modes of action and modelling of ACCase CT domain [D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [26] Sasaki T, Konishi Y. Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, **91**: 3596-3601.