

## 除草剂精喹禾灵用于硅藻过量产生二十碳五烯酸

# Potential Use of the Herbicide Quizalofop-*p*-ethyl for Eicosapentaenoic Acid Overproduction by the Diatom *Nitzschia laevis*

曹小红\*, 李松耀, 王春玲, 鲁梅芳

CAO Xiao-Hong\*, LI Song-Yao, WANG Chun-Ling and LU Mei-Fang

天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品科学与生物技术学院, 天津 300457

Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**摘 要** 硅藻 *Nitzschia laevis* 是 EPA 很好的替代来源。除了对硅藻进行高密度培养外, EPA 的产量还能利用除草剂来提高。本文研究了除草剂精喹禾灵对硅藻的生长和产 EPA 的影响。DMSO 作为除草剂的溶剂, 会对硅藻的生长造成抑制, DMSO 在培养基中的添加量最好不要超过 0.2%。除草剂能对硅藻的细胞形态造成损害, 随着除草剂浓度的增加, 硅藻的产量减低了, 但脂质和 EPA 的含量提高了。当除草剂浓度为 0.1mmol/L 时, EPA 的含量从 3.00% 增加到 3.58%, 提高了 19.3%, EPA 占总脂肪酸的含量也由 25.15% 提高到了 32.88%。实验表明, 除草剂精喹禾灵能促进硅藻 EPA 的积累, 因而在筛选过量产生 EPA 微藻方面有重要用途。

**关键词** 除草剂, 精喹禾灵, 多不饱和脂肪酸, 二十碳五烯酸, 硅藻, 异养

中图分类号 Q949.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0885-06

**Abstract** The diatom *Nitzschia laevis* is a good alternative source of eicosapentaenoic acid (EPA). Besides strategies for high cell density culture, EPA productivity may be further improved by herbicides. The effect of the herbicide quizalofop-*p*-ethyl on the growth and EPA production was studied in this paper. As the solvent of the herbicide, DMSO was proved to inhibit the growth and EPA production of *N. laevis*. The concentration of DMSO in the medium should not exceed 0.2%. Quizalofop-*p*-ethyl could cause morphology damage to the *N. laevis* cells. With the increasing concentration of quizalofop-*p*-ethyl from 0mmol/L to 0.4mmol/L, the dry cell weight production decreased, while at the same time, the lipid content of the dry cell mass increased. When treated with 0.1mmol/L quizalofop-*p*-ethyl, the EPA content increased from 3.00% to 3.58% (of dry cell weight, DW), and the proportion of EPA (20:5) in total fatty acids (TFA) increased from 25.15% to 32.88%. These results indicated that the herbicide quizalofop-*p*-ethyl could stimulate the accumulation of EPA; therefore it might be useful for selecting algae colonies that overproduce EPA.

**Key words** herbicide, quizalofop-*p*-ethyl, polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid, overproduction, *Nitzschia laevis*, heterotrophic

二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)是一种  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids),

Received: January 17, 2007; Accepted: March 22, 2007.

This work was supported by the Tianjin Municipal Science and Technology Commission Basic Research Program (No. 05YFJZJC00700).

\* Corresponding author. Tel: +86-22-60601428; Fax: +86-22-60601332; E-mail: caoxh@tust.edu.cn

天津科委应用基础研究项目基金资助(No. 05YFJZJC00700).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

PUFAs),已经引起了世界范围内研究者的高度重视。EPA 在营养强化、预防和治疗动脉粥样硬化、风湿、心律失常、牛皮癣、糖尿病和癌症方面有着重要的用途<sup>[1]</sup>。鱼油是目前 EPA 的主要商业来源,但是鱼油中的 EPA 和其他不饱和脂肪酸由于环境污染和具有难闻的鱼腥味,往往不适合用于食品添加。近几年,研究者发现海洋微藻是不饱和脂肪酸的初级生产者,一些微藻如 *Nannochloropsis* sp<sup>[2]</sup>, *Porphyridium cruentum*<sup>[3]</sup>, *Phaeodactylum tricomutum*<sup>[4]</sup>, *Monodus subterraneus*<sup>[5]</sup>, and *Nitzschia laevis*<sup>[6]</sup>是 EPA 的较好来源。

硅藻 *Nitzschia laevis* 由于其具有较高的 EPA 含量,因而是 EPA 的很好来源<sup>[7,8]</sup>。这种海洋微藻已经被证明能够利用葡萄糖为唯一碳源,进行异养生长,因而能够大大提高细胞产量<sup>[6]</sup>。研究者进行了大量的实验,以提高硅藻的细胞产量,包括对培养基和培养条件进行优化<sup>[9,10]</sup>,以及建立高效的培养体系<sup>[10-14]</sup>。

提高 EPA 的产量,除了提高硅藻细胞的产量外,还可以利用除草剂处理微藻,以提高细胞中 EPA 的含量。SAN 9785 是一种吡嗪酮的衍生物,在国外已经成功地用于微藻的筛选,提高了细胞中不饱和脂肪酸的含量<sup>[15]</sup>。然而,目前尚没有其他除草剂用于 EPA 过量生产的报道。

精喹禾灵(quizalofop-*p*-ethyl),是一种芳氧苯氧丙酸酯类除草剂。有报道证明它是乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)的有效抑制剂<sup>[16,17]</sup>,而后者是生物体脂肪酸合成的关键酶。该除草剂广泛用于双子叶农作物和一些谷物农田中杂草的控制,其结构式如图 1 所示。据我们所知,目前尚没有该除草剂用于多不饱和脂肪酸过量产生的报道。本文中,我们研究了除草剂精喹禾灵对硅藻生长和产 EPA 的影响,主要探讨其用于硅藻过量产生 EPA。

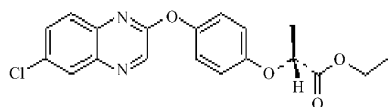


图 1 除草剂精喹禾灵的结构式

Fig. 1 Molecular structure of the herbicide quizalofop-*p*-ethyl

## 1 材料与方法

### 1.1 微藻与培养

硅藻 *Nitzschia laevis* (UTEX2047) 购于美国 UTEX 培养物保藏中心。基础培养基为 LDM 培养基添加 15g/L 葡萄糖, 2g/L NaNO<sub>3</sub> 和 150mg/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·

9H<sub>2</sub>O。细胞在基础培养基中培养一周,然后以 10% 的接种量(V/V)接种到装有 200mL 培养基的 500mL 三角瓶中,25℃ 下 150r/min 振荡培养。培养基的初始 pH 为 8.2,121℃ 灭菌 20min。培养至平稳期,收集细胞,进行产量、脂质和 EPA 含量分析。

### 1.2 除草剂处理

除草剂精喹禾灵由山东省济南科赛基农化工有限公司馈赠。用二甲基亚砜(DMSO)将其配制成浓度分别为 10、25、50、100、200mmol/L 的溶液,培养基灭菌后添加,使除草剂的终浓度分别为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.4mmol/L,培养基中 DMSO 的终浓度为 0.2%。

### 1.3 生物量的测定

生物量用干重法表示。取 5mL 藻液 6000r/min 离心 10min,沉淀用蒸馏水洗涤 2 次,65℃ 下烘干至恒重。

### 1.4 脂质抽提与脂肪酸分析

将生长至平稳期的藻液 6000r/min 离心 10min,沉淀用蒸馏水洗涤 2 次,冷冻干燥,-20℃ 下保存。脂质的抽提采用改进的 Bligh 和 Dyer 的方法<sup>[18]</sup>。抽提物用 N<sub>2</sub> 吹干并称量。

脂质采取直接酸甲酯化法。取一定量的油脂,加入 100μL 4mg/mL 的十七烷酸作为内标物,加入 2mL 4% 的硫酸的甲醇溶液,于 75℃ 水浴中反应 1h。冷却后加入 2mL 生理盐水和 2mL 正己烷,振荡,静置分层后取上层正己烷相,加入无水硫酸钠脱水,进行气相色谱分析。采用上海天美公司 9780 II 型气相色谱仪,FID 检测器,色谱柱为 SE-54 毛细管柱(15m × 0.25mm × 0.25μm),柱温 200℃,进样温度和检测器温度均为 280℃。高纯氮气为载气,流速为 1mL/min,空气流速为 400mL/min,氢气流速为 30 mL/min,尾吹 30mL/min,进样量 1μL,根据 EPA 和内标物的峰面积进行 EPA 的定量。

### 1.5 数据分析

每个实验处理均为 3 个平行,采用 SAS 9.0 软件进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 DMSO 对硅藻生长和产 EPA 的影响

以 DMSO 作为除草剂精喹禾灵的溶剂,因为 DMSO 对微藻的毒害作用比甲醇、乙醇、丙酮、二甲基酰胺(DMF)等小<sup>[19]</sup>。研究了 DMSO 对硅藻的生长影响。图 2 表示了硅藻在不同浓度的 DMSO 条件下的生长曲线。从图中可以看出,DMSO 对硅藻的

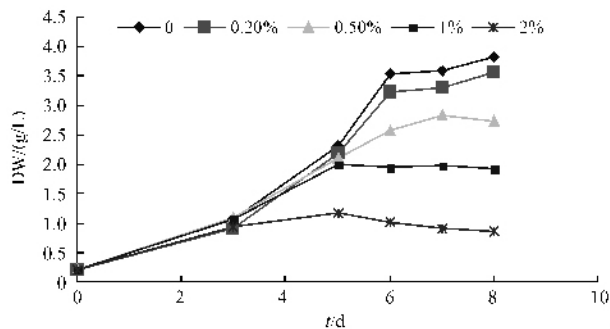


图2 DMSO 的浓度对硅藻 *Nitzschia laevis* 生长的影响  
Fig. 2 Effect of different DMSO concentrations ( V/V ) on the growth of *Nitzschia laevis*  
The basal LDM medium was supplemented with : 15g/L glucose ; 2g/L NaNO<sub>3</sub> and 150 mg/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O. DW , dry cell weight.

生长有一定的毒害作用 ,而且随着浓度的增加而增加。当浓度大于 0.5%( V/V )时 ,硅藻的生长受到严重的抑制 ,而当浓度大于 2% 时 ,硅藻几乎不能生长。Cohen 等<sup>[15]</sup>认为 ,DMSO 的浓度对于微藻

*Porphyridium cruentum* 和 *Spirulina platensis* 应不大于 1% ,我们的研究表明 ,对硅藻 *N. laevis* ,DMSO 在培养基中的浓度最好不大于 0.2%。

DMSO 对硅藻 *N. laevis* 的 EPA 含量也有显著的影响。如表 1 所示 ,当 DMSO 的浓度由 0% 增加到 2% 时 ,EPA 占总脂肪酸的含量 ( EPA/TFA ) 从 31.56% 降低到 22.86% ,当浓度为 0.2% 时 ,EPA 占总脂肪酸的含量为 28.02% ,与对照相比降低不是很多。从表 1 中可以看出 ,当 DMSO 的浓度增加到 2% ,硅藻的产量下降到 0.86 g/L ,EPA 占藻粉的含量 ( % DW ) 也从 3.30% 降低到 2.91%。然而 ,硅藻中脂质的含量却从 24.03% 升高到 38.94% ,可能是由于生长速率受抑制 ,从而导致了脂质的积累。当 DMSO 的浓度为 0.2% 时 ,硅藻的产量和 EPA 的含量均影响不大 ,因此选用 DMSO 在培养基中的浓度为 0.2%。

表 1 不同 DMSO 浓度对硅藻 *Nitzschia laevis* 的生物量、EPA/TFA、EPA 含量 ( % DW ) 和 EPA 产量的影响  
Table 1 Effect of different DMSO concentrations on the DW , lipid content , EPA/TFA , EPA content ( % DW ) and EPA yield of *Nitzschia laevis* . ( DW , dry cell weight , TFA , total fatty acids )

DMSO concentration /( % ( V/V ) )	DW ( g/L )	Lipid content ( % DW )	EPA/TFA / %	EPA content ( % DW )	EPA yield ( mg/L )
0	3.82	24.03 ± 2.06	31.56	3.30 ± 0.39	126
0.2	3.56	30.35 ± 3.00 **	28.02 **	3.24 ± 0.26	115
0.5	2.74	36.29 ± 3.55 ***	27.49 **	3.19 ± 0.08	87
1	1.92	34.68 ± 0.43 ***	28.32 **	2.98 ± 0.35	57
2	0.86	38.94 ± 4.29 ***	22.86 ***	2.91 ± 0.02	25

Data are expressed as average ± SD of triplicate. \*\* and \*\*\* denote  $P < 0.01$  and  $P < 0.005$ , respectively , compared with the control.

2.2 除草剂精喹禾灵对硅藻的生长和产 EPA 的影响

研究了除草剂精喹禾灵对硅藻细胞形态的影响。图 3 是硅藻细胞在不同浓度的精喹禾灵条件下的显微形态变化。从图中可以看出 ,随着除草剂浓度的增加 ,硅藻细胞形态上的损害也在增加。没有加入精喹禾灵时 ,硅藻细胞完整 ,形状规则 ,细胞生长旺盛 ,排列致密有序 ,能看到明显的细胞壁 ( 图 3 A )。当浓度为 0.02mmol/L 时 ,硅藻细胞形态没有明显的改变 ,仅有少量的颗粒状物质 ,可能是由细胞内部释放出来的 ( 图 3 B )。当浓度为 0.05mmol/L 时 ,细胞形态依然完整 ,但是处于分散状态 ,排列不紧密 ( 图 3 C )。当浓度大于 0.05mmol/L 时 ,细胞形态严重破坏 ,不能观察到完整的细胞壁 ,受到严重的毒害 ( 图 3 D、E、F )。

除草剂精喹禾灵对硅藻的产量也有显著的抑制作用 ,如表 2 所示。当除草剂的浓度由 0 增加到 0.4mmol/L 时 ,硅藻的产量由 3.52g/L 降低到 1.22

g/L ,但是脂质含量却从 32.31% 增加到 39.00% ,可能是由于除草剂降低了硅藻的生长速率 ,从而有利于脂质的积累。硅藻 *N. laevis* 由于能积累 25% 以上的油质 ,因此可以认为是一种富含油质的微藻<sup>[20]</sup> ,多数微藻在最适生长条件下生长迅速 ,但是不利于脂质的积累 ,而当生长受到其他因素的抑制时 ,开始大量积累脂质。因此硅藻脂质含量的提高可能是由于除草剂的抑制作用。

随着精喹禾灵浓度的增加 ,EPA 含量逐渐增高 ,如表 2 所示。没有用除草剂处理时 ,EPA 的含量为 3.00% ( 占干重 ) ,当精喹禾灵的浓度为 0.1mmol/L 时 ,EPA 含量升高到 3.58% ,增加了 19.3%。继续增加除草剂的浓度 ,EPA 的增加作用不再明显。当除草剂浓度为 0.05mmol/L 时 ,尽管硅藻的产量受到一定的影响 ,但是由于 EPA 占藻粉的含量提高 ,因此单位发酵液 EPA 的产量并没有降低 ( 108mg/L ,对照为 106mg/L )。

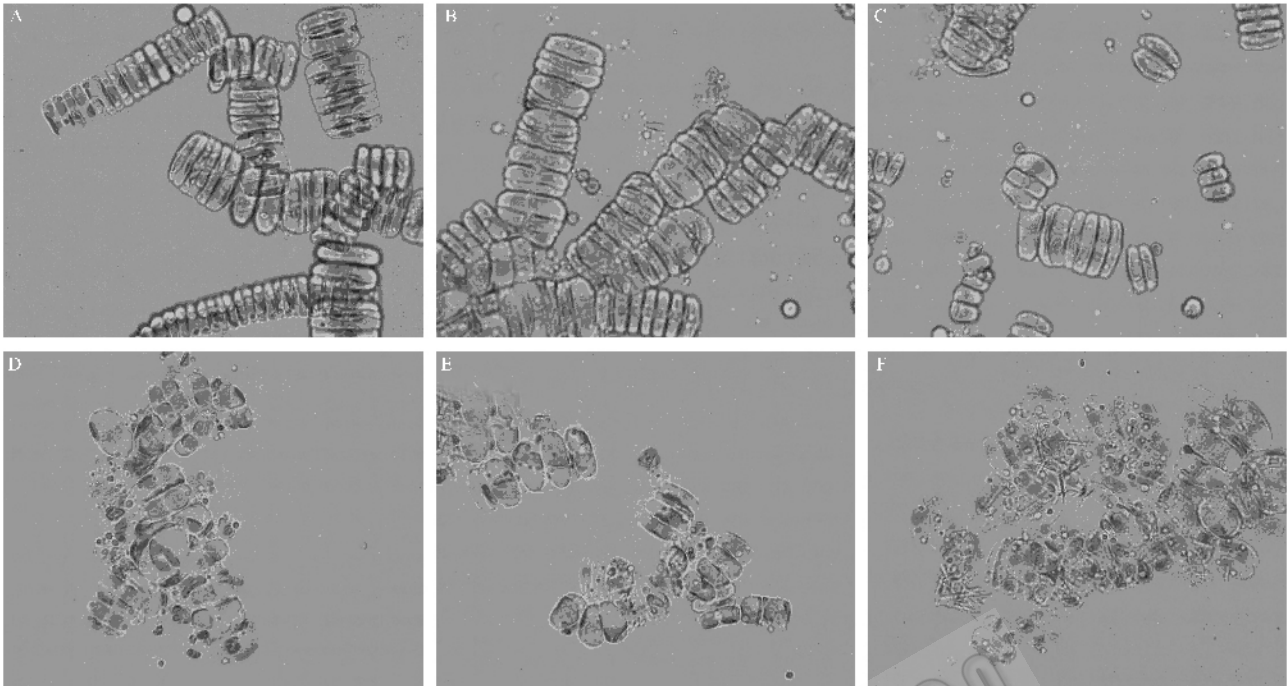


图3 不同除草剂浓度下的硅藻细胞形态显微镜照片

Fig. 3 Microscopic photographs of *Nitzschia laevis* cells treated with different concentrations of quizalofop-*p*-ethyl  
A : control ; B : 0.02mmol/L ; C : 0.05mmol/L ; D : 0.1mmol/L ; E : 0.2mmol/L ; F : 0.4mmol/L. The DMSO concentration in the medium was 0.2% ( V/ V ). Cells were observed under optical microscopy ( Motic , DMB5-5 ) at 2000 × magnification at the end of the cultivation ( 8th day ).

表2 精喹禾灵浓度对硅藻 *N. laevis* 的生物量、脂质含量、EPA 含量和 EPA 产量的影响

Table 2 Effect of different quizalofop- <i>p</i> -ethyl concentrations on the DW , lipid content , EPA content ( % DW ) and EPA yield of <i>N. laevis</i>				
Quizalofop- <i>p</i> -ethyl concentration( mmol/L )	DW( g/L )	Lipid content( % DW )	EPA content( % DW )	EPA yield( mg/L )
0	3.52	32.31 ± 0.20	3.00 ± 0.07	106
0.02	3.46	35.45 ± 2.15 **	2.95 ± 0.01	102
0.05	3.10	35.80 ± 1.30 **	3.48 ± 0.09	108
0.1	2.48	39.00 ± 0.10 * **	3.58 ± 0.04	89
0.2	1.53	38.85 ± 0.15 * **	3.45 ± 0.32	53
0.4	1.22	37.65 ± 2.85 * **	3.54 ± 0.16	43

The DMSO concentration in the medium was 0.2% ( V/V ). DW , dry cell weight. Data are expressed as average ± SD of triplicate. \*\* and \*\*\* denote  $P < 0.01$  and  $P < 0.005$  , respectively , compared with the control

表3 列出了除草剂精喹禾灵对硅藻的脂肪酸组成的影响。硅藻的脂肪酸主要由 14:0 , 16:0 , 16:1 和 20:5 组成 , 占总脂肪酸含量的 95 % 左右。当除草剂的浓度由 0 增加到 0.1mmol/L 时 , 14:0 和 16:0 的

含量分别由 16.31 % 和 14.63 % 降低到 9.53 % 和 12.31 % , 而 16:1 的含量很稳定 , 几乎没有变化。其他脂肪酸的含量很低 , 占总脂肪酸的比例均小于 2 % 。 EPA 占总脂肪酸的含量由 24.68 % 增加到

表3 不同精喹禾灵浓度对硅藻 *N. laevis* 脂肪酸组成的影响

Table 3 Effect of different quizalofop- <i>p</i> -ethyl concentrations on the fatty acid composition of <i>Nitzschia laevis</i>						
Quizalofop- <i>p</i> -ethyl concentration( mmol/L )	Fatty acids composition / %					TFA( % DW )
	14 ∶ 0	16 ∶ 0	16 ∶ 1	20 ∶ 5	others	
0	16.31 ± 1.03	14.63 ± 0.19	40.13 ± 2.08	24.68 ± 0.18	4.43 ± 0.69	12.16
0.02	13.76 ± 0.30	14.82 ± 0.82	40.51 ± 0.60	25.15 ± 0.96 *	5.76 ± 0.46	11.73
0.05	9.59 ± 0.73	11.55 ± 0.28	41.01 ± 2.39	29.81 ± 0.54 * **	8.04 ± 0.67	11.67
0.1	9.53 ± 0.25	12.31 ± 0.29	40.01 ± 1.58	32.88 ± 1.07 * **	5.27 ± 0.80	10.89
0.2	9.87 ± 0.27	13.07 ± 0.27	39.96 ± 0.84	32.24 ± 0.20 * **	4.88 ± 0.51	10.70
0.4	10.14 ± 0.16	13.21 ± 0.88	40.16 ± 1.68	32.55 ± 2.03 * **	3.94 ± 0.14	10.88

The DMSO concentration in the medium was 0.2% ( V/V ). TFA , total fatty acids. Data are expressed as average ± SD of triplicate. \* and \*\*\* denote  $P < 0.05$  and  $P < 0.005$  , respectively , compared with the control.

32.88% ,很可能是由于 14:0 和 16:0 的含量的减少。当除草剂的浓度大于 0.1mmol/L 时 ,EPA 的含量不再增加。脂质的含量随着除草剂浓度的增加而增加 (表 2 ) ,而总脂肪酸的产量 ( % DW ) 却有所减少 ,这表明脂质中总脂肪酸 ( TFA ) 的含量减少了。

3 讨论

SAN 9785 是处理微藻最常用的除草剂 ,它是  $\omega$ -3 去饱和过程的有效抑制剂 ,能够降低高等植物和微藻甘油酯中  $\alpha$ -亚麻酸的含量 ,这方面的报道很多<sup>[21]</sup>。SAN 9785 能够改变微藻脂肪酸的组成 ,但是 ,仅少数微藻中的多不饱和脂肪酸如  $\gamma$ -亚麻酸和 EPA 的含量有所增加 ,而且 ,一种脂肪酸含量的增加

往往是以其他一种或几种脂肪酸含量的降低为代价的。另外 ,SAN 9785 和其他除草剂由于能抑制脂肪算合成的特定位点 ,更多的用于研究微藻和植物中脂肪酸的合成过程<sup>[21 , 22]</sup>。

精喹禾灵是一种芳氧苯氧丙酸酯类除草剂 ,已经被证明是细胞内乙酰辅酶 A 羧化酶( ACCase )的有效抑制剂<sup>[16 , 17 , 23]</sup>。因此可以认为 ,精喹禾灵对硅藻的毒性是由于对硅藻的细胞内的乙酰辅酶 A 羧化酶的毒性而造成的。本论文研究了除草剂精喹禾灵对硅藻的生长和产 EPA 的影响 ,由于这种毒性 ,硅藻的生长受到抑制 ,但是 EPA 占总脂肪酸的含量反而显著增加。表 4 中表示了近年来除草剂在提高微藻不饱和脂肪酸方面的研究进展。

表 4 除草剂在提高微藻不饱和脂肪酸含量方面的研究进展  
Table 4 Advance of herbicide application for fatty acids enhancement

Herbicides	Microalgae	Fatty acid	Increase range( % of TFA )	Reference
SAN 9785	<i>Porphyridium cruentum</i>	EPA 20 :5 ( $\omega$ -3 )	38.2 – 41.1	[ 24 ]
SAN 9785	<i>Monodus subterraneus</i>	EPA 20 :5 ( $\omega$ -3 )	22.5 – 34.8	[ 15 ]
SAN 9785	<i>Spirulina platensis</i>	GLA 18 :3 ( $\omega$ -6 )	33.3 – 39.0 ( of GL # # )	[ 25 ]
SAN 9785	<i>Porphyridium cruentum</i>	EPA 20 :5 ( $\omega$ -3 )	29.1 – 45.4 ( of GL )	[ 25 ]
SHAM #	<i>Parietochloris incisa</i>	18 :1 ( $\omega$ -9 + $\omega$ -7 )	15.6 – 55.3	[ 26 ]
Quizalofop- <i>p</i> -ethyl	<i>Nitzschia laevis</i>	EPA 20 :5 ( $\omega$ -3 )	24.68 – 32.88	This work

# SHAM , Salicylhydroxamic acid

# # GL , galactolipid

现在我们尚无法解释精喹禾灵对硅藻 EPA 合成的促进作用的详细机制。有报道表明 ,除草剂 SAN 9785 在大豆中迅速降解 ,从而减少了其对大豆的毒害作用<sup>[21]</sup>。另外 ,生物体可能通过对乙酰辅酶 A 羧化酶的修饰 ,也可能通过增加细胞内乙酰辅酶 A 羧化酶的表达量 ,从而减少受除草剂的毒害作用<sup>[27]</sup>。精喹禾灵对硅藻 EPA 合成的促进作用可能与后两种机制中的至少一种有关。因此 ,EPA 的过量产生可以看作是对除草剂的一种抵抗和适应。

我们的研究表明 ,除草剂精喹禾灵能够显著提高硅藻 EPA 的含量 ,但是 EPA 的这种量产生在传代的过程中是否稳定有待于进一步研究 ,其促进 EPA 合成的详细机制也有待于深入探讨。精喹禾灵对硅藻 EPA 合成的促进作用 ,使我们有望利用它筛选到稳定的高产 EPA 的硅藻品系。我们也希望 EPA 在硅藻和其他微藻中的过表达能够应用于实际生产当中 ,进而解决目前 EPA 资源紧缺的问题。

致 谢 感谢天津科技大学现代分析技术研究中心的杨志岩教授和闫仲丽老师在气相色谱分析方面给予的帮助。

REFERENCES ( 参考文献 )

[ 1 ] Nettleton JA. Omega-3 fatty acids and health. New York : Chapman and Hall , 1995.

[ 2 ] Seto A , Wang HL , Hesseltine CW. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima* . *J Am Oil Chem Soc* , 1984 , **61** : 892 – 894.

[ 3 ] Cohen Z , Vonshak A , Richmond A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum* : correlation to growth rate. *J Phycol* , 1988 , **24** : 328 – 332.

[ 4 ] Yongmanitchai W , Word QP. Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in batch and continuous culture system. *J Am Oil Chem Soc* , 1992 **69** : 584 – 590.

[ 5 ] Cohen Z. Production potential of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus*. *J Am Oil Chem Soc* , 1994 **71** : 941 – 945.

[ 6 ] Wen ZY , Chen F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* . *Biotechnol Lett* , 2000 , **22** : 727 – 733.

[ 7 ] Lebeau T , Robert JM. Diatom cultivation and biotechnology relevant products : Part II . Current and putative products. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2003a , **60** : 624 – 632.

[ 8 ] Tan CK , Johns MR. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. *J Appl Phycol* , 1996 **8** : 59 – 64.

- [ 9 ] Wen ZY , Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* : effects of silicate and glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol* , 2000b **25** : 218 – 224.
- [ 10 ] Wen ZY , Chen F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* . *Enzyme Microb Technol* , 2001a **29** : 341 – 347.
- [ 11 ] Wen ZY , Jiang Y , Chen F. High cell density of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production : fed-batch development. *Process Biochem* , 2002 **37** : 1447 – 53.
- [ 12 ] Wen ZY , Chen F. Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production : physiological study and process optimization. *Biotechnol Prog* , 2002a , **18** 21 – 28.
- [ 13 ] Wen ZY , Chen F. Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. *Process Biochem* , 2002b **38** : 523 – 29.
- [ 14 ] Wen ZY. A high yield and productivity strategy for eicosapentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis* in heterotrophic culture. Ph.D. Dissertation. Hong Kong : The University of Hong Kong , 2001.
- [ 15 ] Cohen Z , Norman HA , Heimer YM. Potential use of substituted pyridazinone for selecting polyunsaturated fatty acid overproduction cell lines of algae. *Phytochemistry* , 1993a **32** : 259 – 264.
- [ 16 ] Gronwald , JW. Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci* , 1991 , **39** : 435 – 449.
- [ 17 ] Egli MA , Gengenbach BG , Gronwald JW. Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol* , 1993 , **101** : 499 – 506.
- [ 18 ] Bligh EG , Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Phycol* , 1959 , **21** : 72 – 81.
- [ 19 ] Okumura Y , Koyama J , Takaku H , *et al.* Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001 , **41** : 123 – 128.
- [ 20 ] Ratledge C , Evans CT. Lipids and their metabolism. In : Rose AH , Harrison JS ( eds ) *The yeasts* , 2nd ed. London : Academic Press , 1989 , pp. 367 – 455.
- [ 21 ] Murphy DJ , Harwood JL , Lee KA , *et al.* Differential responses of a range of photosynthetic tissues to a substituted pyridazinone , Sandoz 9785. Specific effects on fatty acid desaturation. *Phytochemistry* , 1985 , **24** : 1923 – 1929.
- [ 22 ] Khozin I , Cohen Z. Different response of microalgae to the substituted pyridazinone , Sandoz 9785 , reveal different pathways in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* , 1996 , **42** ( 4 ) : 1025 – 1029.
- [ 23 ] Burton JD , Gronwald JW , Somers DA , *et al.* Inhibition of corn acetyl-CoA carboxylase by cyclohexanedione and aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 1989 , **34** : 76 – 85.
- [ 24 ] Cohen Z , DiDi S , Heimer YM. Overproduction of  $\gamma$ -linolenic and eicosapentaenoic acid by algae. *Plant Physiol* , 1992 , **98** : 569 – 572.
- [ 25 ] Cohen Z , Reungjitchachawali M , Siangdung W , *et al.* Herbicide-resistant lines of microalgae : growth and fatty acid composition. *Phytochemistry* , 1993b , **34** : 973 – 978.
- [ 26 ] Bigogno C , Khozin-Goldberg I , Cohen Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalgae *Parietochloris incise* ( Trebuxiophyceae , Chlorophyta ). *Phytochemistry* , 2002 , **60** : 135 – 143.
- [ 27 ] Walsh CT. Suicidal substrates , mechanism-based enzyme inactivators : recent developments. *Annu Rev Biochem* , 1984 , **53** : 493 – 535.