

# 海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 的脂类特征 与分类探讨\*

冯福应 杨文林 伟<sup>†</sup> 姜桂珍 许亦农<sup>1)</sup> 匡廷云

(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 北京 100093)

<sup>†</sup>(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

**提要** 采用生化分析方法研究了海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 色素、极性脂及其脂肪酸组成特点。结果表明, *Chlorella* sp. 1061 色素、极性脂及其脂肪酸组成均与小球藻属的其它藻类存在着很大差异。绿藻纲中的主要化合物, 如叶绿素 *b*、十六碳四烯酸 [16:4(n-3)] 和亚麻酸 [18:3(n-3)] 均未在 *Chlorella* sp. 1061 中检测到。从 *Chlorella* sp. 1061 中分离到占总极性甘油酯 8mol% 的甜菜碱-1,2-二酰基甘油-0-4'-(N, N, N-三甲基)高丝氨酸(DGTS), 并从半乳糖脂和 DGTS 等极性甘油酯中检测到大量的二十碳五烯酸 [20:5(n-3)] (EPA)。但是一般认为, 小球藻属藻类中不含这两种化合物。根据 *Chlorella* sp. 1061 的这些特点, 作者认为它不应该被归到小球藻属中。由于 *Chlorella* sp. 1061 在色素、极性甘油酯及其脂肪酸组成特征方面与大眼藻纲(Eustigmatophyceae)中的拟微绿球藻(*Nannochloropsis*)非常相似, 因此, *Chlorella* sp. 1061 可能是 *Nannochloropsis* 中的一个种。

**关键词** 海洋小球藻, 化学分类, 脂肪酸, 叶绿素 *b*, 1, 2-二酰基甘油-0-4'-(N, N, N-三甲基)高丝氨酸

**中图分类号** Q946.81

单细胞微藻种类繁多, 在生物圈内分布极其广泛。由于基于形态描述的传统分类方法很难将缺乏形态特征的微藻准确地进行分类, 人们常常借助其它一些方法研究这些体积微小的藻类的类群归属问题。化学分类即是其中的一种常用方法, 这种方法以糖类、脂类(色素、极性甘油酯、脂肪酸和萜类等)、蛋白和核酸等化学分子为标志, 比较和阐述不同藻类之间的亲缘和进化关系, 在微藻的分类和系统进化研究中占有重要地位。

脂类是生物体内非常重要的一类化合物, 包括色素、固醇、甘油酯和脂肪酸等, 其种类和组成与藻类种群有密切的关系。这些化合物中的光合色素、极性甘油酯和脂肪酸常被人们用作微藻分类的标志物质(Schluter *et al*, 1997; Viso *et al*,

1993)。藻类的光合色素除叶绿素 *a* 之外, 还有叶绿素 *b*、藻胆素和类胡萝卜素等辅助色素, 这些辅助色素在不同藻类之间存在着很大差异(Rowan, 1989; Schluter *et al*, 1997)。1, 2-二酰基甘油-0-4'-(N, N, N-三甲基)高丝氨酸(diacylglyceryltrimethylhomoserine, DGTS)是一种广泛分布在藻类中的甜菜碱脂, 它是大眼藻纲(Eustigmatophyceae)的拟微绿球藻(*Nannochloropsis*)中的主要极性甘油酯之一(Schneider *et al*, 1994), 而在绿藻纲中的绿藻目中却不存在这种脂(Eichenberger, 1982; Sato, 1992)。藻类中的脂肪酸种类繁多, 一些特征脂肪酸的种类和组成常被作为微藻的化学分类依据(Volkman *et al*, 1989)。陆开宏等(2001)将淡水小球藻海水驯化和将海洋小球藻淡水驯化

\* 国家重点基础研究发展规划项目资助, G1998010100 号; 国家自然科学基金项目资助, 30270337 号。冯福应, 博士, 现在厦门大学环境科学研究中心进行博士后研究, E-mail: ffypx@hotmail.com

1) 通讯作者, 许亦农, E-mail: yinongxu@ibcas.ac.cn

收稿日期: 2003-05-08, 收修改稿日期: 2004-01-13

后,其特征脂肪酸种类仍旧没有改变,说明用特征脂肪酸作为微藻分类标志是可靠的。最近还有研究还表明,藻类的特征脂肪酸不仅可作为分类的依据,还可用来分析藻类间的进化关系(Graeve *et al.*, 2002)。

海洋小球藻是我国海水养殖中最常用的饵料藻之一(林伟等, 2000),小球藻一般被归属于绿藻纲的绿藻目小球藻科(Van den Hoek *et al.*, 1995)。俞建江等(1999)、李荷芳等(1999)分别对两种海洋微藻(*Chlorella* sp-1, *Chlorella* sp-2)的脂肪酸组成进行了分析,发现这两种藻的脂肪酸组成与典型的绿藻纲藻类的脂肪酸组成差别很大,并对这两种藻的分类归属提出了质疑。在本研究中,作者对一种海洋微藻(*Chlorella* sp. 1061)的色素、极性甘油酯及其脂肪酸组成进行了分析,并对其分类归属进行了讨论。

## 1 材料与方 法

### 1.1 微藻来源及其培养

海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 由中国科学院海洋研究所提供。将藻种转移到盛有 250ml 人工海水(Harrison *et al.*, 1980)的三角瓶中,在光照培养箱培养[温度为 18℃;光照强度为 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光暗周期比为 14h:10h]。每天定时摇动 6 次。用分光光度计测定波长为 750nm 的吸光值以确定其生长时期。当藻细胞处于后对数生长期时,采用离心法收集藻细胞。

### 1.2 色素分析

色素用甲醇提取。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)进行色素的定性和定量分析(Thayer *et al.*, 1990)。叶绿素含量测定采用标准的分光光度法进行(Strickland *et al.*, 1972)。参照 Mantoura 等(1983)公式  $C_{\text{car}} = C_{\text{chl}} \times [(\epsilon_{\text{chl}} \times A_{\text{car}}) / (\epsilon_{\text{car}} \times A_{\text{chl}})]$  对类胡萝卜素进行定量计算,式中  $C$ 、 $\epsilon$  和  $A$  分别代表浓度、消光系数和色谱峰面积。

### 1.3 极性甘油酯和脂肪酸分析

**1.3.1 脂的提取、分离和鉴定** 脂的提取参照 Bligh 等(1959)的方法进行。用双向薄板层析法(TLC)分离不同极性甘油酯(Vogel *et al.*, 1992),硅胶板(G型, 10cm  $\times$  10cm)购自青岛海洋化工厂。第一向展开液为氯仿/甲醇/水(65:25:4, V/V/V),第二向展开液为氯仿/甲醇/异丙氨/浓氨水(65:35:0.5:5, V/V/V/V)。在硅胶薄板上均匀喷洒 0.01% (W/V) 樱草灵的丙酮/水(60:40)混合液。在紫外光(波长 366nm)下确定

各脂斑点在层析板上的位置(许亦农等, 2002)。不同脂的鉴定根据标准脂图谱和磷脂、糖脂以及甜菜碱脂的特定显色反应进行(Vogel *et al.*, 1990)。

**1.3.2 极性甘油酯及其脂肪酸组成分析** 将薄板上的含有不同极性甘油酯的硅胶分别刮入具塞玻璃试管中,然后往试管中加入 30 $\mu\text{g}$  十七碳酸(17:0, 气相色谱内标)、1.5ml 硫酸/甲醇混合液(5:95, V/V)和氮气,置试管于 85℃ 水浴中进行甲基化 1h。用配有氢火焰检测器的 HP6890 气相色谱仪对脂肪酸进行定性和定量分析。色谱柱为 HPINNOWAX (30m  $\times$  0.25mm, I. D.),载气为氮气,流速为 0.8ml/min。分析采用程序升温控制。170℃ 初始化 3min,然后以 5℃/min 从 170℃ 升到 210℃ 并保持 11min,最后以 2℃/min 从 210℃ 升到 230℃。火焰离子检测器的温度设置为 230℃,样品进样口气化温度 230℃。根据标准脂肪酸(购自 Supelco, Lot No.: LA-98232)保留时间确定样品脂肪酸种类。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色素种类和组成

在本实验中,作者采用 RP-HPLC 方法对 *Chlorella* sp. 1061 的色素进行了定性和定量分析。RP-HPLC 色谱图中有 6 个主要吸收峰(图 1),根据与标准图谱保留时间( $R_t$ )以及各峰所对

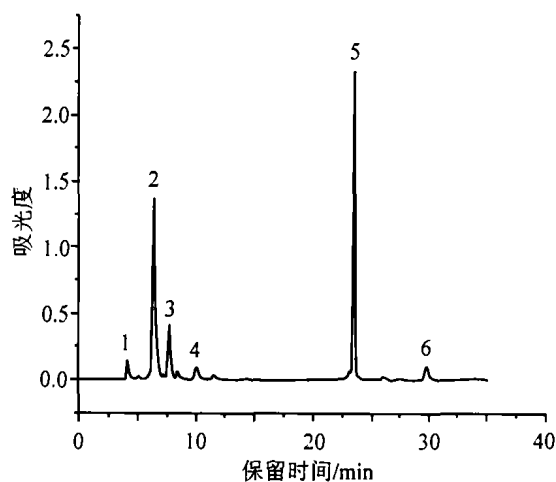


图 1 海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 色素的 RP-HPLC 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC absorbance (440nm) chromatograms of pigments from marine microalga *Chlorella* sp. 1061  
图中数字表示:1. neoxanthin; 2. violaxanthin;  
3. antheraxanthin; 4. lutein; 5. chlorophyll a;  
6.  $\beta$ -carotene

应色素在 400—700nm 吸收图谱分析,确定各峰所对应色素分别为新黄质(neoxanthin)、紫黄质(violaxanthin)、花药黄质(antheraxanthin)、叶黄素(lutein)、叶绿素 *a* (chlorophyll *a*) 和  $\beta$ -胡萝卜素( $\beta$ -carotene)。表 1 给出各种色素的含量。叶绿素 *a* 和紫黄质是 *Chlorella* sp. 1061 中最丰富的色素,其含量分别占总色素的 67.4% 和 19.7%。在本工作中,作者没有从 *Chlorella* sp. 1061 分离到叶绿素 *b*。迄今为止,在所有被研究的绿藻纲藻类中

都含有叶绿素 *b*,因此,叶绿素 *b* 是绿藻纲的标志色素分子(Rowan, 1989; Schluter *et al*, 1997)。另外,在所有被检测的藻类中,拟微绿球藻的光合色素组成非常特殊,这类藻只含有叶绿素 *a*,但不含其它叶绿素和藻胆素(Gladu *et al*, 1995),这是拟微绿球藻最显著的化学分子特征。类似现象尚未在其它藻类中发现。*Chlorella* sp. 1061 与拟微绿球藻的色素组成特征相吻合。

表 1 海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 色素含量( $\mu\text{g/ml}$  培养基)

Tab.1 Pigment contents in marine microalga *Chlorella* sp. 1061 ( $\mu\text{g/ml}$  culture medium)

色素	叶绿素 <i>a</i>	$\beta$ -胡萝卜素	叶黄素	花药黄质	紫黄质	新黄质
含量( $\mu\text{g/ml}$ )	1.2229	0.0382	0.0348	0.1275	0.3570	0.0337

## 2.2 极性甘油酯种类和组成

采用双向 TLC 的方法,从 *Chlorella* sp. 1061 中分离出 10 种极性甘油酯,经特异性化学显色反应及与标准脂 TLC 图谱比较,其中 9 种分别被确定为单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、双半乳糖甘油二酯(diagalactosyldiacylglycerol, DGDG)、硫代异鼠李糖甘油二酯(sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG)、磷脂酰甘油油(phosphatidylglycerol, PG)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱

(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、1, 2-二酰基甘油-0-4'-(N, N, N-三甲基)高丝氨酸(diacylglyceryltrimethylhomoserine, DGTS)。10 种脂的相对含量列于表 2。*Chlorella* sp. 1061 的主要极性甘油酯为 MGDG、DGDG、SQDG、PC、DGTS 和 PG,其中光合类囊体膜脂 MGDG、DGDG、SQDG 和 PG 的含量约占总极性甘油酯的 71%,说明 *Chlorella* sp. 1061 的光合膜脂是其主要的极性甘油酯。含有甜菜碱脂 DGTS 是 *Chlorella* sp. 1061 的

表 2 海洋微藻 *Chlorella* sp. 1061 极性甘油酯及脂肪酸组成(mol%)

Tab.2 Compositions of polar glycerolipids and fatty acids (mol%) in marine microalga *Chlorella* sp. 1061

脂肪酸	脂的种类									
	MGDG	DGTS	PG	PE	SQDG	DGDG	PC	PI	PS	UL*
14:0	9.1	4.4	0.9	2.2	3.7	8.9	13.2	5.0	32.0	3.0
16:0	10.8	21.1	32.7	40.6	54.3	34.7	21.5	52.6	43.3	62.3
16:1	6.6	23.7	6.4	24.7	42.0	28.3	42.5	36.1	4.8	0.0
16:1(3t)	0.0	0.0	33.81	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	1.4	2.1	4.6	10.8	0.0	0.4	6.0	1.3	7.0	2.4
18:1	0.5	4.1	0.5	14.0	0.0	0.9	5.1	4.9	13.1	8.1
18:2	0.7	1.6	0.7	5.7	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.0
20:2	0.3	0.0	1.7	0.0	0.0	2.5	0.9	0.0	0.0	23.9
20:4	3.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:5(n-3)	67.0	41.3	18.8	2.0	0.0	24.4	5.6	0.0	0.0	0.0
脂肪(mol%)	33.9	8.1	5.6	1.4	14.4	17.9	12.9	4.2	0.7	1.1

\* UL 表示未被鉴定的脂

一个显著特点。DGTS 在自然界中的分布相当广泛,真菌、藻类、苔藓及蕨类等真核生物中的很多种类都能合成 DGTS (Dembitsky, 1996)。虽然 DGTS 在亚细胞结构中的位置及其生物功能至今尚不清楚,但是很多研究表明,DGTS 存在与否及含量与植物类群和进化有密切的关系 (Dembitsky, 1996)。在绿藻纲中,含有 DGTS 的藻均属于团藻目或多枝藻目,但是在绿藻目中还未检测到 DGTS。因此,绿藻目被普遍认为不含 DGTS,而小球藻属于绿藻纲绿藻目。Eichenberger (1982) 和 Sato (1992) 的研究指出小球藻不含 DGTS。虽然 Haigh 等 (1996) 的曾报道编号为 UTEX 2341 (定名为 *Chlorella minutissima*) 的小球藻含有高水平的 DGTS,对小球藻不含 DGTS 提出了质疑,但是,一些化学分析研究表明,UTEX 2341 在色素、脂肪酸和固醇等方面均不具备小球藻的特征,而与大眼藻纲特征相似,应该归到大眼藻纲 (Gladu *et al*, 1995)。Dembitsky (1996) 指出,藻类中 DGTS 的存在与否和含量高低可以显示其分类信息。较高水平的 DGTS 是大眼藻纲拟微绿球藻属中藻类的特征之一 (Schneider *et al*, 1994)。本实验中的所用材料虽然被定名为 *Chlorella sp.* 1061,但是这种藻含有高含量的 DGTS (8.1 mol%),具有明显的大眼藻纲拟微绿球藻特征。

PC 是生物界构成生物膜的重要的磷脂之一,在常见的膜脂中其结构与 DGTS 最相似。大多数含有 PC 的生物都不含 DGTS,而含有 DGTS 的生物都不含 PC,故认为 DGTS 和 PC 可能有相互替代的关系 (Sato, 1992)。本实验结果表明,*Chlorella sp.* 1061 中在含有 8.1% 的 DGTS 的同时,PC 的含量也很高,达到了 12.9%,说明在 *Chlorella sp.* 1061 中 DGTS 的功能可能并不只是起替代 PC 的作用。

### 2.3 极性甘油酯中脂肪酸组成

与陆生高等植物相比较,海洋微藻中的脂肪酸种类和组成更为复杂,除了棕榈酸 (16:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2) 等常见的脂肪酸外,还含有 20:5(n-3) 等超长链多不饱和脂肪酸。大量研究表明,不同藻类脂肪酸种类及其含量有着独特的特点,可作为海藻的系统分类的指标 (Volkman *et al*, 1989; 俞建江等, 1999; 李荷芳等, 1999; Graeve *et al*, 2002)。为了进一步探讨海洋微藻 *Chlorella sp.* 1061 的分类归属问题,作者对其不同的极性甘油酯脂肪酸组成进行了分析,其结果

列于表 2。从 *Chlorella sp.* 1061 中检测到 11 种脂肪酸,其中最主要的脂肪酸为 20:5(n-3)、16:0、16:1 和 14:0。这些脂肪酸在各级性脂中的相对含量非常不同,其中 20:5(n-3) 主要分布在 MGDG、DGDG、DGTS 和 PG,而在其它脂中,C16 为相对含量最高的脂肪酸。绿藻纲微藻最主要的脂肪酸特点是其富含 18:3(n-3) 和 16:4(n-3)。作者的结果表明,*Chlorella sp.* 1061 不含有上述两种脂肪酸,因此,这一藻种完全没有绿藻纲的脂肪酸特点,而与大眼藻纲藻类的脂肪酸组成类似。在大眼藻纲拟微绿球藻中,20:5(n-3)、16:0、16:1 为其主要脂肪酸 (Maruyama *et al*, 1986),尤其是 EPA 的相对含量较高,使得其中一些种被认为是自 20 世纪 80 年代以来欧洲工业化生产 EPA 最有潜力的藻种之一 (Zhang *et al*, 2001)。

### 3 结论

小球藻属是绿藻纲绿藻目中的一个属,然而作者的分析表明,*Chlorella sp.* 1061 不具有小球藻属的特征:(1) 叶绿素 *b* 是绿藻纲的特征色素,然而 *Chlorella sp.* 1061 中不含这种色素,其光合色素主要为叶绿素 *a* (Chl *a*) 和类胡萝卜素;(2) *Chlorella sp.* 1061 含有约 8 mol% 的甜菜碱脂 1,2-二酰基甘油-0-4'-(N, N, N-三甲基)高丝氨酸 (DGTS),以往的研究表明小球藻属中的藻类不含这种脂;(3) *Chlorella sp.* 1061 不含绿藻纲的特征脂肪酸十六碳四烯酸 [16:4(n-3)] 和亚麻酸 [18:3(n-3)],但却含有大量的小球藻属中藻类不具有的二十碳五烯酸 [20:5(n-3)]。这些结果充分说明 *Chlorella sp.* 1061 不应该归属于小球藻属;相反,其色素、极性甘油酯及其脂肪酸的种类和组成与大眼藻纲中的拟微绿球藻的非常相似。*Chlorella sp.* 1061 应归于大眼藻纲拟微绿球藻属的一个种 (*Nannochloropsis sp.*)。

**致谢** 中国科学院植物研究所光合作用中心王则能博士、张群高级实验师和冯丽洁高级实验师提供帮助,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 李荷芳,周汉秋,1999. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 30: 34—39
- 林伟,陈 驹,刘秀云,2000. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点的比较. 海洋与湖沼, 31: 647—652

- 陆开宏, 林霞, 2001. 海、淡水驯化对 5 种微藻脂肪酸组成的影响. 水生生物学报, 25: 179—184
- 许亦农, 王则能, 严小军等, 2002. 褐藻 *Ectocarpus fasciculatus* 甘油酯合成过程中脂肪酸在甘油中的位置分布. 科学通报, 47: 998—1002
- 俞建江, 李荷芳, 周汉秋, 1999. 10 种海洋微藻总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成. 水生生物学报, 23: 481—488
- Bligh E G, Dyer W J, 1959. A rapid method of total lipid extractions and purification. Can J Biochem Physiol, 37: 911—917
- Dembitsky V M, 1996. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. Prog Lipid Res, 35(1): 1—51
- Eichenberger W, 1982. Distribution of diacyl-O-4'-(N, N, N-trimethyl) homoserine in different algae. Plant Sci Lett, 24: 91—95
- Gladu P K, Patterson G W, 1995. Sterol, fatty acid and pigment characteristic of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). J Phycol, 31: 774—777
- Graeve M, Kattner G, Wiencke C *et al.*, 2002. Fatty acid composition of arctic and antarctic macroalgae; indicator of phylogenetic and trophic relationships. Marine Ecology Progress Series, 231: 67—74
- Haigh W G, Yoder T F, Ericson L *et al.*, 1996. The characterisation and cyclic production of a highly unsaturated homoserine lipid in *Chlorella minutissima*. Biochim Biophys Acta, 1299(2): 183—190
- Harrison P J, Waters R E, Taylor F J R, 1980. A broad spectrum artificial medium for coastal and open phytoplankton. J Phycol, 16: 28—35
- Mantoura R F C, Llewellyn C A, 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoids pigments and their breakdown products in natural water by reverse-phase high performance liquid chromatography. Anal Chim Acta, 151: 297—314
- Maruyama I, Nakamura T, Matsubayashi T *et al.*, 1986. Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. Jap J Phycol, 34: 319—325
- Rowan K S, 1989. Photosynthetic Pigments of Algae. Cambridge Univ Press, Cambridge, 317—319
- Sato N, 1992. Betaine lipids. Bot Mag Tokyo, 105: 185—197
- Schluter L, Havskum H, 1997. Phytoplankton pigments in relation to carbon content in plankton communities. Mar Ecol Prog Ser, 155: 55—65
- Schneider J C, Roessler P, 1994. Radiolabeling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga. J Phycol, 30: 594—598
- Strickland J D, Parsons T R, 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish Res Board Can Bull, 167: 1—310
- Thayer S S, Bjorkman O, 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. Photosynthesis Res, 23: 331—343
- Van den Hoek C, Mann M, Jahns H M, 1995. Algae—An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, 231—233
- Viso A C, Marty J C, 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. Phytochemistry, 34: 1521—1533
- Vogel G, Eichenberger W, 1990. Biosynthesis and Metabolism of Betaine Lipids in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae). In: Quinn P J, Harwood J L ed. Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization. London; Portland Press, 235—237
- Vogel G, Eichenberger W, 1992. Betaine lipids in lower plants. biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the possible role of DGTS in lipid metabolism. Plant Cell Physiol, 33: 427—436
- Volkman J K, Jeffery S W, Nichols P D *et al.*, 1989. Fatty acid and lipid composition of species of microalgae used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol, 128: 219—240
- Zhang C-W, Zmora O, Kopel R *et al.*, 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Aquaculture, 195: 35—49

## LIPID CHARACTERISTICS AND TAXONOMIC IMPLICATION OF MARINE MICROALGAE *CHLORELLA* SP. 1061

FENG Fu-Ying, YANG Wen, LIN Wei<sup>†</sup>, JIANG Gui-Zhen,

XU Yi-Nong, KUANG Ting-Yun

(Key Laboratory of Photosynthetic and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093)

<sup>†</sup>(Key Laboratory of Marine Experimental Biology, Institute of Oceanology,  
Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** *Chlorella* species, unicellular common green algae, are widely distributed in different waters (fresh water and sea), soil and air. Because of easy cultivation and (or) enriched bioactive products, some are used as models for the study of plant metabolism and function. Researchers on *Chlorella* face many problems caused by unclear traditional classification of *Chlorella*. As morphological characteristics are few, it is difficult to classify *Chlorella* cells correctly using traditional taxonomic methods. Chemotaxonomy is therefore an importance alternative in algae classification. Chemotaxonomy classification is based on internal differences in chemistry including pigments, fatty acids, lipids, protein and nucleic acids.

One marine strain, identified as *Chlorella* sp. 1061, is widely used in China as feed for rotifers and brine shrimp. Unlike bright green color in other *Chlorella* strains, *Chlorella* sp. 1061 is dull yellow-green indicating that *Chlorella* sp. 1061 may have distinct pigments. Differences are also seen in fatty acids. *Chlorella* sp. 1061 contains higher amounts of EPA than other *Chlorella* strains do. Therefore, the taxonomic position of *Chlorella* sp. 1061 is questionable.

On the other hand, although *Chlorella* sp. 1061 is widely cultivated in China with high potential commercial value of high amount of EPA, few physiological and biochemical data is available. Considering collectively the pigment, polar glycerolipids, fatty acid and membrane lipid of *Chlorella* sp. 1061, the taxonomic position of *Chlorella* sp. 1061 should be reconsidered.

Pigment composition of *Chlorella* sp. 1061 was analyzed by HPLC, 6 special peaks were identified according to retain time of standards indicating 6 pigments. TLC and GC were applied to characterize membrane lipids and fatty acids of this alga.

Marine microalga *Chlorella* sp. 1061 has been traditionally placed below class Chlorophyceae, order Chlorococcales and genus *Chlorella*, yet the chemical analysis results has revealed that *Chlorella* sp. 1061 were largely distinguished in biochemistry from other *Chlorella*. In Chlorophyceae, Chlorophyll *b* is one of the major photosynthetic pigments; and 16:4(n-3) and 18:3(n-3) are the major fatty acids. However, these compounds have not yet been detected in *Chlorella* sp. 1061 that contains no other chlorophyll but chlorophyll *b*, and no phycobilins. As we know, only members of Eustigmatophyceae were found to have the biochemical characteristics. Also Eustigmatophyceae members can produce a relatively high content of betaine lipid diacylglyceryltrimethylhomoserine (DGTS) eicosapentaenoic acid [20:5(n-3)]. *Chlorella* species, however, are thought to be unable to produce DGTS and 20:5(n-3), and yet both were found in *Chlorella* sp. 1061. DGTS level amounted to about 8 mol% of total polar glycerolipids while Eicosapentaenoic acid, the major fatty acid in this alga, was mainly distributed in monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), diagalactosyldiacylglycerol (DGDG), DGTS, and phosphatidylglycerol (PG). All these results all suggest that *Chlorella* sp. 1061 is not a member of the genus *Chlorella*, but rather belongs to Eustigmatophyceae, perhaps *Nannochloropsis* sp.

**Key words** Marine *Chlorella*, Chemotaxonomy, Fatty acids, Chlorophyll *b*, Diacylglyceryltrimethylhomoserine (DGTS)