

Chimica e biologia a confronto: pigmenti e altri metaboliti secondari prodotti da dinoflagellati del Lago di Tovel

Rita FRASSANITO*, Ines MANCINI & Graziano GUELLA

Laboratorio di Chimica Bioorganica, Dipartimento di Fisica, Università di Trento, Via Sommarive 14, I-38050 Povo (TN)

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: frassani@science.unitn.it

RIASSUNTO - *Chimica e biologia a confronto: pigmenti e altri metaboliti secondari prodotti da dinoflagellati del Lago di Tovel* - Nel presente lavoro è stato usato un approccio di tipo chimico per comprendere le cause del mancato arrossamento del Lago di Tovel, studiando il metabolismo secondario delle specie dinoflagellate del Lago di Tovel riconducibili al '*Glenodinium sanguineum*' descritto da Baldi. In particolare, sono stati presi in esame in dettaglio, tramite tecniche spettroscopiche sui composti puri e/o mediante metodologie LC/UV-MS *on-line*, i principali metaboliti (pigmenti, galattolipidi, MAAs) della specie *Gs-green*, dominante nel lago e che costituiva quasi una coltura pura nelle *enclosures*. Il carotenoide ritenuto responsabile dell'arrossamento, l'astaxantina, era in sostanza assente. L'analisi dei pigmenti, effettuata con tecniche *on-line* su pochissime cellule della coltura in laboratorio del dinoflagellato appartenente alla "serie rossa" *sensu* Baldi, ha evidenziato una differenza molto netta tra i carotenoidi appartenenti a questa specie e quelli del *Gs-green* e di altre specie dinoflagellate del lago.

SUMMARY - *Chemistry as opposed to biology: Pigments and other secondary metabolites of dinoflagellates from Lake Tovel* - In this paper, the authors used a chemical approach to contribute to the understanding of the disappearance of the reddening phenomenon of Lake Tovel, by studying the secondary metabolism of the dinoflagellate species of Lake Tovel that morphologically resemble '*Glenodinium sanguineum*' as described by Baldi. The dominant species *Gs-green*, collected from the enclosures in Lake Tovel, has been analysed in detail, and the major constituents (pigments, galactolipids, MAAs) have been recognized by isolation and spectroscopic characterization of pure compounds and/or by *on-line* LC/UV-MS methodologies. In this species a very low amount of astaxanthin has been detected. The *on-line* pigment analysis of few cells of the axenic culture of *Gs-red*, that agrees with the "red form" of '*G. sanguineum*' described by Baldi, shows a peculiar carotenoid pattern, different from *Gs-green* and from other dinoflagellate species of Lake Tovel.

Parole chiave: dinoflagellati, metaboliti secondari, carotenoidi, tecniche spettroscopiche

Key words: dinoflagellates, secondary metabolites, carotenoids, spectroscopic techniques

1. INTRODUZIONE

1.1. I dinoflagellati del Lago di Tovel

Il *Glenodinium sanguineum* Marchesoni, dinoflagellato descritto da Baldi (1938; 1941) e Dodge *et al.* (1987) e pienamente caratterizzato da Marchesoni (1941), è in realtà uno *species complex* di almeno tre specie sorelle che, anche se apparentemente molto simili dal punto di vista morfologico, si differenziano per stagionalità ed esigenze ecologiche (Flaim *et al.* 2004). Allo stato attuale delle conoscenze sembra che solamente una di queste specie sia responsabile delle forti fioriture del passato. La tassonomia di questo dinoflagellato, come delle altre due alghe dello *species complex*, non è stata ancora chiarita, perciò in que-

sto studio le microalghe in oggetto saranno indicate come segue: *Gs-red*, la specie ritenuta responsabile dell'arrossamento, in seguito battezzata *Tovellia sanguinea* sp. inedit., *Gs-DK*, il dinoflagellato studiato da Dodge, e *Gs-green*, la specie maggioritaria presente nei mesocosmi, poi denominata *Baldinia anaunensis* gen. inedit. sp. inedit.

1.2. Il nostro approccio

Nel presente lavoro si è posta particolare attenzione alla rilevazione quali- e quantitativa dei pigmenti carotenoidici ritenuti responsabili della colorazione nei dinoflagellati in esame. Si è cercato però di non trascurare metaboliti secondari appartenenti ad altre classi biogenetiche, tra cui i lipidi, che giocano un

ruolo strutturale e funzionale nella membrana cellulare, in qualche modo definendo la molecolarità dell'ambiente in cui opera lo stesso apparato fotosintetico di queste microalghe e rappresentando spesso un utile *marker* filogenetico, alternativo a quello rappresentato dai pigmenti spesso solo a livello di divisione algale.

Nelle prime fasi della ricerca l'attenzione è stata essenzialmente focalizzata sulle biomasse estraibili, costituite principalmente da dinoflagellati, campionate nei mesocosmi (*enclosures*) del Lago di Tovel in quantità tale da poter fare un ampio *screening* chimico-biorganico dei costituenti metabolici della microalga ritenuta responsabile dell'arrossamento. Nelle fasi successive la definizione delle reali specie responsabili del fenomeno e la messa in coltura della specie *Gs-red* ha chiarito molte delle problematiche emerse anche nel nostro lavoro.

1.3. Stato dell'arte

Sui carotenoidi della specie responsabile dell'arrossamento le sole conoscenze presenti in letteratura si riferiscono a quattro lavori del prof. Vittorio Gerosa: tre degli anni 1960-1964 (Gerosa 1959, 1961, 1966), in un periodo in cui il Lago di Tovel presentava una forte colorazione rossastra, e un ultimo (Gerosa 1970) quando ormai il fenomeno stava scomparendo (prearrossamento della fine giugno 1967). Attraverso estrazioni con solventi organici, reazioni chimiche di idrolisi, analisi cromatografiche e spettrofotometriche, il prof. Vittorio Gerosa riuscì a stabilire che il pigmento più abbondante in tutte le fasi del fenomeno era l'astaxantina (**1**), un carotenoide di colore rosso (ϵ_{\max} 475 nm in etere di petrolio) noto fino a quel tempo solo nel mondo animale (Fig. 1).

La determinazione strutturale di Gerosa era basata sul comportamento chimico all'idrolisi basica e con t-butossido di potassio/aria della soluzione contenente l'estratto dei pigmenti (Gerosa 1959) e su dati spettrofotometrici del pigmento isolato da cromatografia su strato sottile (Gerosa 1966). La presenza di questo pigmento non fu confermata dagli ultimi esperimenti dello stesso Gerosa (Gerosa 1970), che trovò una miscela di pigmenti del tutto diversa da quella originariamente messa in luce agli inizi degli anni '60 senza poter arrivare peraltro alla delucidazione strutturale di

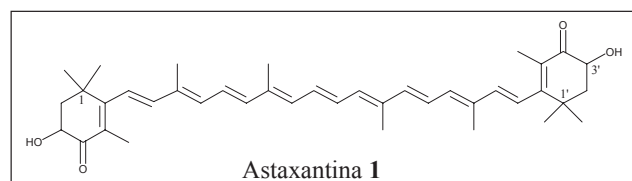


Fig. 1 - Formula strutturale dell'astaxantina.

Fig. 1 - Structure of astaxanthin.

alcuno di questi. I metodi analitici utilizzati dal prof. Gerosa sono, pur nel loro rigore scientifico, di tipo comparativo (o relativo) e non metodi *ab initio* (assoluti). Inoltre, un campione di riferimento di astaxantina commerciale era a disposizione solo nella seconda serie di misure, nelle quali peraltro l'astaxantina stessa era assente dagli estratti di '*G. sanguineum*' (Gerosa 1970).

2. LA RACCOLTA MASSIVA DEL GS-GREEN NELL'ESTATE 2001

2.1. La raccolta del materiale biologico e l'estrazione delle cellule mobili di *Gs-green*

I campioni da analizzare sono stati prelevati in diverse occasioni nelle estati 2001-2003 mediante filtraggio, con opportuno retino, delle acque negli *enclosures* posti nel Lago di Tovel (Cantonati *et al.* 2003).

La sospensione della biomassa di *Gs-green* è stata trattata in due modi diversi:

a) filtrata sotto vuoto su un *gooch* in vetro sinterizzato o su filtro in fibra di vetro. La biomassa di glenodini rimasta sulla superficie del filtro è stata estratta direttamente con acetone commerciale ottenendo una soluzione giallina di estratto organico, che poi è stato concentrato sotto vuoto a temperatura ambiente, flussato con azoto per togliere l'ossigeno presente e conservato in freezer (-18 °C). I glenodini apparivano a questo punto come una polvere biancastra.

b) centrifugata a 1400 xg per 20 minuti. Dopo che la biomassa si è depositata sul fondo della provetta, l'acqua è stata rimossa, è aggiunto acetone per l'estrazione e si è centrifugata ancora a 900 xg. La soluzione organica giallina è stata tolta con una pipetta, concentrata in vuoto a temperatura ambiente, flussata con azoto e conservata in freezer (-18 °C).

Da analisi successive non si sono notate differenze quali- o quantitative significative tra i due metodi; il primo offre però vantaggi di maggiore praticità. Non si è ritenuto necessario dover fare prove di estrazione con solventi diversi, poiché la letteratura più recente indica l'acetone come il solvente più adatto per l'estrazione di pigmenti. Sono state usate, inoltre, tutte le precauzioni necessarie per evitare la degradazione dei pigmenti, operando il più possibile in assenza di luce ed evitando la presenza di acqua nel contenitore di stoccaggio dell'estratto, che deve essere scuro.

2.2. Analisi cromatografiche preliminari su strato sottile

L'analisi Thin Layer Chromatography (TLC) rappresenta anche oggi una delle tecniche più rapide (e meno costose) per avere una visione d'insieme della complessità di una miscela di molecole organiche (na-

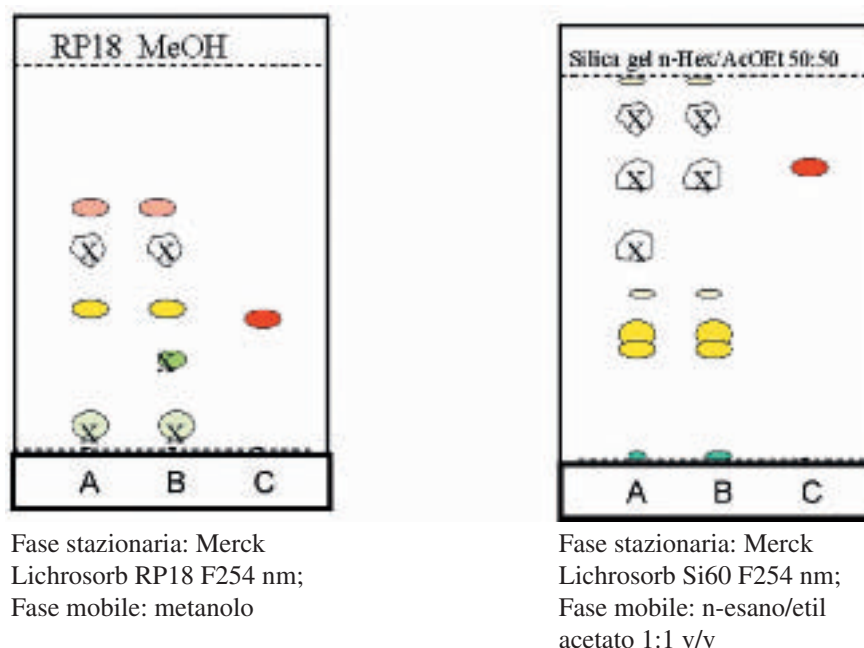


Fig. 2 - Cromatografia liquida su strato sottile degli estratti del dinoflagellato denominato *Gs-green* da *enclosures* (mesocosmi) in due raccolte del 2001 su fasi stazionarie diverse. In entrambi i casi nelle righe A e B sono stati posti i due estratti, mentre nella riga C è stato posto un campione di astaxantina commerciale. In verde e barrate (per indicare la fluorescenza) le clorofille e i loro prodotti di degradazione; in giallo, in rosso (astaxantina) e in rosa i carotenoidi.

Fig. 2 - Thin layer chromatography of the organic extracts of the dinoflagellate *Gs-green* from the *enclosures* (two field samples of 2001) by different stationary phases. In the lines A and B are the two extracts, and in the line C is the commercial astaxanthin. The green and marked spots suggest the presence of chlorophylls and their degradation products; the yellow, red (astaxanthin) and pink spots show the carotenoids.

turali o sintetiche). Una riproduzione fedele (anche se *cartoon*) della TLC di due estratti viene riportata in figura 2, accanto al comportamento TLC (fase inversa RP18 e fase diretta Si60) nelle stesse condizioni dell'astaxantina (campione commerciale Sigma). Le *spots* colorate che non danno fluorescenza a 350 nm sono indicative della presenza di carotenoidi, mentre quelle (generalmente verdi) che mostrano questo fenomeno sono dei pigmenti clorofilliani.

Si può facilmente notare la buona corrispondenza tra i due estratti e la comparsa di un ulteriore pigmento clorofilliano nella seconda raccolta, e soprattutto l'assenza, almeno ai livelli di sensibilità di questa tecnica (decimi di microgrammo), dell'astaxantina. Mentre nella TLC di sinistra si notano delle *spots* gialle a indice di ritenzione vicino a quello dell'astaxantina (*spot* rossa), in quella di destra gli indici di ritenzione sono molto diversi e indicano la presenza di carotenoidi di polarità più elevata dell'astaxantina stessa.

2.3. Isolamento dei metaboliti secondari

L'estratto complessivo di due raccolte massive effettuate nel 2001 è stato evaporato ottenendo 107 mg di un olio giallo-verdastro, che è stato sottoposto a

flash cromatografia su RP-18 usando un gradiente acetonitrile/metanolo come fase mobile. Si sono raccolte 7 frazioni di 40 ml ciascuna e tutte sono state ritestate in TLC e in HPLC/DAD-MS (dettagli nel paragrafo seguente) ottenendo le seguenti indicazioni:

- frazione 1: tracce di composti;
- frazione 2: presenza di pigmento rosso;
- frazione 3: presenza di pigmenti rosso e lipidi;
- frazione 4: presenza di pigmenti rosso, giallo e lipidi;
- frazione 5: presenza di pigmento giallo e pigmenti verdi;
- frazione 6: presenza di pigmento giallo e pigmenti verdi;
- frazione 7: presenza di pigmento arancione e clorofilla *a*.

2.3.1. Pigmenti

Dopo analisi LC-MS e NMR, le frazioni 2 e 3 sono state riunite e sottoposte a flash cromatografia su fase diretta (Lichrolut Si60), usando un gradiente esano/acetato di etile come fase mobile. Questa tecnica risulta molto comoda quando si lavora su pigmenti che assorbono nella zona del visibile, poiché permette

di raccogliere delle frazioni in corrispondenza delle bande colorate eluite. La frazione II era una miscela, i cui componenti sono stati successivamente separati in HPLC (colonna Si60, esano/acetato di etile 95/5). Il composto presente in maggiore quantità in questa frazione, eluito con un ottimo grado di purezza al tempo di ritenzione di 8,2 minuti e caratterizzato in modo univoco da NMR e spettrometria di massa, corrispondeva al carotenoide **2**, la peridinina (Strain *et al.* 1971; Joansen *et al.* 1974) (vedi sezioni seguenti per dati NMR e altri dati spettroscopici).

Anche le frazioni 5 e 6 sono state riunite e sottoposte a flash cromatografia su fase diretta (Lichrolut Si60) usando, come prima, un gradiente esano/acetato di etile come fase mobile. Anche la frazione III era una miscela, i cui componenti sono stati successivamente separati in HPLC (colonna Si60, esano/acetato di etile 95/5). Il composto presente in maggiore quantità in questa frazione, eluito con un ottimo grado di purezza al tempo di ritenzione di 11,2 minuti e caratterizzato in modo univoco da NMR e spettrometria di massa, corrispondeva al carotenoide **3** (diadinoxantina A) (Joansen *et al.* 1974) (vedi sezioni seguenti per dati NMR).

Dalla frazione 7, contenente principalmente clorofilla *a*, si è arrivati, dopo *flash* cromatografia su fase diretta (Lichrolut Si60) con gradiente esano/acetato di etile, all'isolamento di una frazione poco polare 7/I, che è stata successivamente purificata su Lichrolut RP18 con metanolo/acetone, ottenendo principalmente clorofilla *a* e il carotenoide **4** (β -carotene). Il *Gs-green*, invero, produce anche altri pigmenti oltre quelli carotenoidici già citati (in ordine di polarità crescente **4**, **3** e **2**) e da noi univocamente rivelati. I cromatogrammi sull'estratto grezzo mostravano, infatti, la presenza di altri caroteni minoritari (alcuni dei semplici isomeri geometrici dei caroteni principali) e di clorofille.

2.3.2. Composti galattolipidici

L'estrazione delle cellule di *Gs-green* porta anche all'isolamento di una serie piuttosto estesa e interessante di metaboliti che appartengono alla classe biogenetica dei galattolipidi, cioè mono- e di-galattolipidi formati da catene lipidiche altamente insature.

I mono-galattolipidi sono costituiti da un'unità glicerolica che risulta acilata da catene lipidiche in posizione 2 e 3, e legata in posizione 1 con un galattosio.

In figura 3 sono rappresentate le strutture di mono- e di-galattolipidi (aventi due unità di galattosio al C3), dove con R_1 e R_2 si vuole indicare l'acido grasso posizionato rispettivamente in posizione 1 e in posizione 2 sullo scheletro di glicerolo.

È ben noto che i galattolipidi sono i costituenti fondamentali della membrana fotosintetica e in particolare delle membrane tilacoidi, proprio dove avviene il processo fotosintetico primario (Gounaris *et al.*

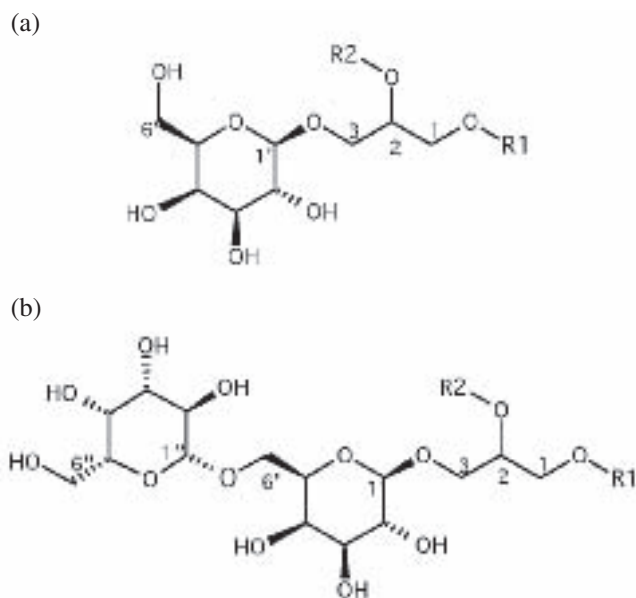


Fig. 3 - Formule strutturali di mono-galattolipidi (a) e di-galattolipidi (b).

Fig. 3 - Structures of mono-galactolipids (a) and di-galactolipids (b).

1983). Questa classe di composti possiede, inoltre, attività biologiche molto importanti (Mukarami *et al.* 1995).

Il ritrovamento e l'isolamento per la prima volta di queste molecole nel microrganismo in studio riveste quindi un sicuro interesse e potrebbe rilevarsi molto importante per approfondimenti futuri.

La frazione contenente i galattolipidi è stata in seguito ulteriormente purificata mediante *flash* cromatografia per ottenere due frazioni a polarità significativamente diversa:

- la prima contenente essenzialmente i mono-galattolipidi, meglio chiamati MonoGalattosil-Diacilgliceroli (MGDG);
- la seconda contenente essenzialmente i di-galattolipidi, meglio chiamati DiGalattosil-Diacilgliceroli (DGDG).

Il rapporto in massa delle due frazioni è risultato MGDG/DGDG \approx 2,0.

La frazione MGDG è anche stata purificata in HPLC preparativa (RP18 MeOH 100%) ottenendo circa 1 mg di composto.

2.4. Delucidazione strutturale

La delucidazione strutturale dei metaboliti isolati, soprattutto di quelli che per noi rivestono maggior interesse, è stata fatta seguendo uno schema ben collaudato nel nostro laboratorio, che prevede in generale l'uso sia di metodi spettroscopici sia chimici. Nel no-

stro approccio abbiamo dato le strutture finali solo a quei composti che siamo riusciti a isolare in quantità (da 0,1 a 2 mg) almeno sufficiente per la registrazione di uno spettro $^1\text{H-NMR}$ oltre naturalmente per la registrazione di spettri di massa. Solo con queste tecniche si può avere un'informazione puntuale sulle caratteristiche strutturali delle molecole indagate. Il limite maggiore della spettroscopia NMR è la sua scarsa sensibilità intrinseca, dovuta al fatto che l'intensità del segnale NMR è comparabile con quello del rumore termico dei circuiti elettronici usati per misurarlo, problema questo risolvibile solo con uso di spettrometri ad alto campo magnetico e con circuiti RF opportunamente stabilizzati.

2.4.1. Carotenoidi

2.4.1.1. Dati da spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

I campioni precedentemente purificati sono stati indagati fino alla fine del 2003 attraverso uno spettrometro NMR Varian XL-300 operante a 300 MHz, e successivamente con un nuovo spettrometro NMR Bruker Avance 400 MHz.

In figura 4 sono riportate le strutture dei tre pigmenti carotenoidici isolati con i dati NMR relativi (*chemical shift*).

2.4.1.2. Dati da spettrometria di massa (MS)

Anche lo spettro di massa di una sostanza fornisce informazioni strutturali molto importanti, che sono in qualche modo complementari con quelle ottenute da spettroscopia NMR, e soprattutto permette di risalire alla formula molecolare del composto in esame. Sono stati usati due spettrometri: il primo (KRATOS MS80) è uno strumento classico con sorgente a impatto elettronico (EI) in condizioni di alto vuoto e analizzatore a doppio fuoco elettrostatico-magnetico, il secondo (BRUKER ESQUIRE) usa sorgenti a pressione atmosferica, ESI (*electrospray*), o APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e analizzatore quadrupolare (trappola ionica). I carotenoidi sono composti non volatili e termolabili che richiedono, perciò, l'uso dell'ESI o dell'APCI. I carotenoidi più polari (es. peridina o astaxantina) formano facilmente intensi ioni addotto con il sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ mediante ESI in ioni positivi, mentre i carotenoidi apolari (es. β -carotene) sono facilmente rilevabili con APCI in ioni positivi.

2.4.2. Mono- e di-galattolipidi

Per arrivare a conoscere la struttura di questo tipo di composti, senza la strumentazione descritta nel paragrafo precedente (MS/MS e NMR) o senza una quantità adeguata di composto per eseguire misure di $^{13}\text{C-NMR}$ (Diehl *et al.* 1995), occorre una lunga

e qualche volta inaffidabile sequenza di reazioni idrolitiche enzimatiche in grado di rompere selettivamente le funzioni aciliche sul carbonio glicerolico secondario e quindi di permettere l'identificazione dei grassi costituenti, sfruttando il fatto che questi enzimi (lipasi) sono in grado di idrolizzare selettivamente la catena acilica primaria (Murakami *et al.* 1994). Oltre alla laboriosità, questo metodo presenta alcuni altri svantaggi dovuti al fatto che spesso la catena secondaria non idrolizzata subisce migrazione acilica verso la posizione primaria libera durante il processo di *work-up* (Mancini *et al.* 1998). Nel nostro approccio, invece, una volta verificata la natura galattolipidica del metabolita attraverso misure NMR, la natura e la posizione delle catene lipidiche viene stabilita da misure di spettrometria di massa (*full scan*) e da frammentazione controllata (Guella *et al.* 2003). In ioni negativi si ha una prima indicazione del tipo di composto (mono-galattolipide o di-galattolipide), il peso molecolare e la composizione dei due acidi grassi, come si può notare nella figura 5, nella quale sono riportati gli spettri dei mono-galattolipidi 18:5/18:5 e 20:5/18:4 (Fig. 5a) e del di-galattolipide 18:4/18:4 (Fig. 5b), e sono molto evidenti gli ioni $[\text{M}-\text{H}]^-$ e gli anioni carbossilato dei due acidi grassi. In ioni positivi si conferma il peso molecolare e in più, isolando e frammentando lo ione $[\text{M}+\text{Na}]^+$, si ottengono spettri MS/MS molto semplici (la figura 6 mostra quello relativo al mono-galattolipide 20:5/18:4) e risolutivi nella determinazione della posizione relativa dei due acidi grassi sullo scheletro di glicerolo. In questo tipo di composti, gli ioni risultanti dalla perdita dei due acidi grassi dallo ione $[\text{M}+\text{Na}]^+$ sono gli unici presenti per quanto riguarda gli spettri dei mono-galattolipidi e i principali in quelli dei di-galattolipidi; inoltre, lo ione risultante dalla perdita dell'acido grasso *sn-1* è sempre il più abbondante tra i due, come dimostra il confronto con galattolipidi in cui la posizione relativa degli acidi grassi è stata stabilita tramite altri metodi (Guella *et al.* 2003).

3. IL MONITORAGGIO

L'analisi dei metaboliti secondari sui numerosi campioni provenienti dal Lago di Tovel è stata effettuata con l'approccio descritto precedentemente, a causa della complessità delle operazioni richieste e soprattutto della scarsità di materiale a nostra disposizione. Perciò, sulla base delle importanti indicazioni forniteci dalla caratterizzazione *off-line* dei principali metaboliti secondari delle cellule mobili di *Gs-green* – la specie principale il cui *bloom* era stato indotto nelle *enclosures* –, abbiamo messo a punto una metodica on-line che servisse non solo a seguire i composti precedentemente riconosciuti, ma a riconoscerne e a caratterizzarne di nuovi (Frassanito *et al.* 2005). Tale

metodica si basa sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) con eluizione a gradiente accoppiata parallelamente al *detector* a serie di diodi (DAD) e allo spettrometro di massa a

trappola ionica (ITMS). Il riconoscimento dei picchi cromatografici si effettua sulla base di tre parametri: 1) il confronto del tempo di ritenzione dei composti incogniti, rispetto a dei composti commerciali o na-

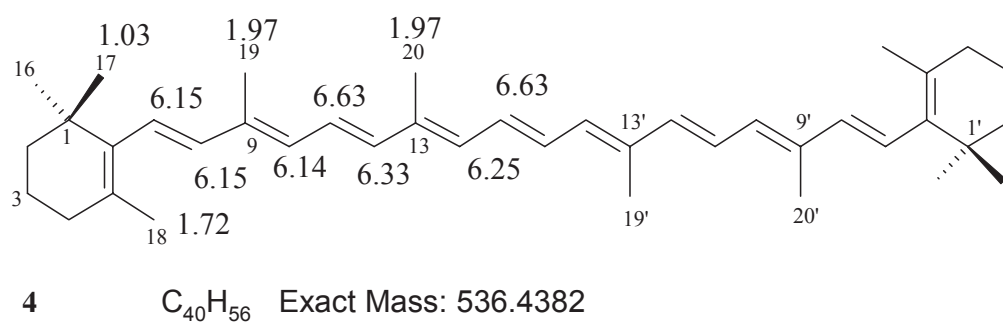
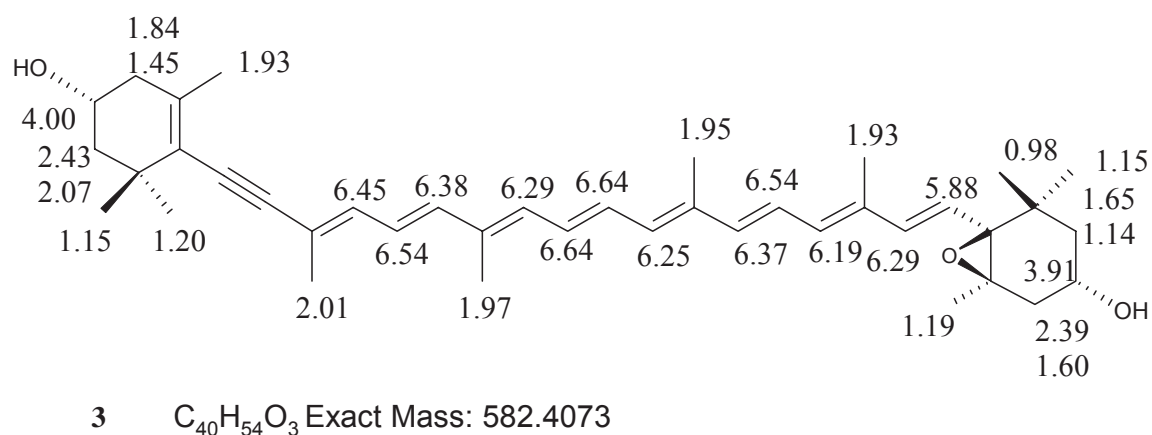
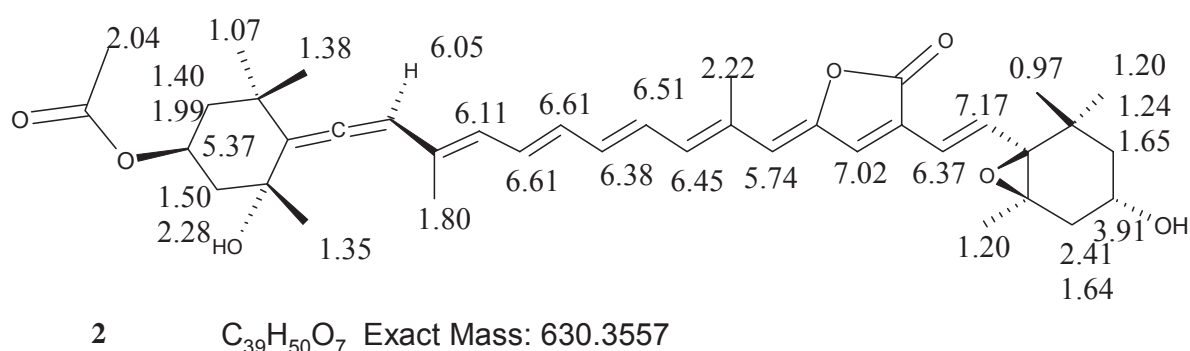


Fig. 4 - Formule strutturali dei principali carotenoidi del *Gs-green* e relativi dati spettroscopici di risonanza magnetica nucleare.

Fig. 4 - Structures of the main carotenoids of *Gs-green* and their 1H -NMR data.

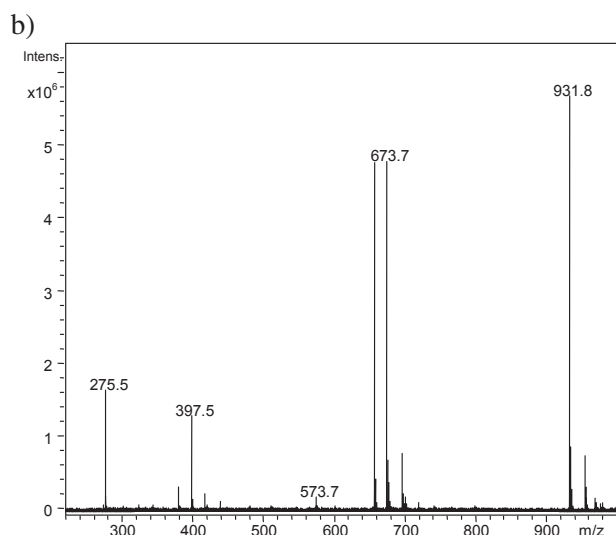
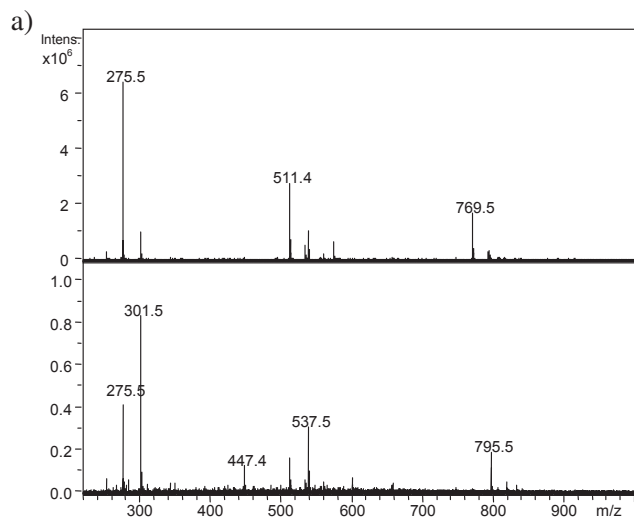


Fig. 5 - Spettri di massa in ioni negativi dei mono-galattolipidi aventi peso molecolare 770 e 796 Da (a) e del di-galattolipide avente peso molecolare 932 Da (b).

Fig. 5 - Negative-ion mass spectra of two mono-galactolipids (MW 770 and 796 Da) (a) and of a di-galactolipid (MW 932 Da) (b).

turali, da noi isolati e caratterizzati; 2) lo spettro UV-Visibile ottenuto on-line con il DAD confrontato con altri spettri riportati in letteratura; 3) lo spettro MS e/o MS/MS ottenuto on-line con tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica (ESI o APCI). In questo modo è stato possibile analizzare cellule di *Gs-green* in diverse condizioni di sperimentazione (in seguito a variazioni di nutrienti o di irraggiamento con luce negli *enclosures*), in diversi stati fisiologici (mobili o incistate). Inoltre, sono state eseguite numerose analisi su retinate orizzontali e verticali del fitoplancton del lago stesso.

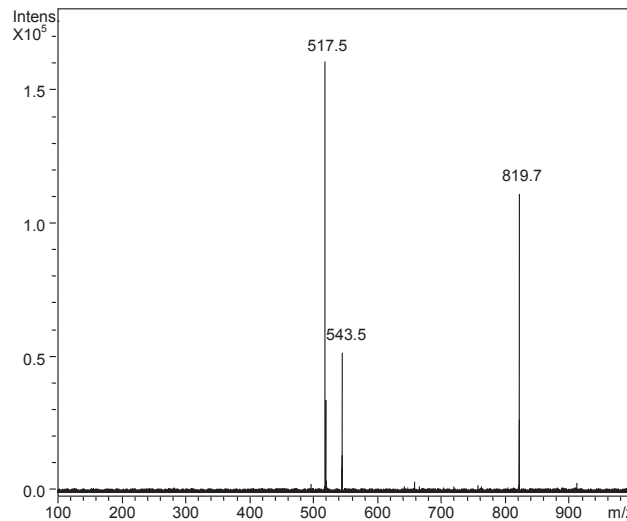


Fig. 6 - Spettro di massa in ioni positivi ottenuto per collisione (MS^2) dello ione pseudomolecolare a m/z 819.

Fig. 6 - Positive-ion mass spectrum obtained by the collision (MS^2) of the pseudomolecular ion at m/z 819.

3.1. Analisi dell'estratto grezzo delle cellule mobili di *Gs-green*

3.1.1. I pigmenti

La figura 7a riporta il profilo cromatografico a 450 nm (lunghezza d'onda intorno alla quale tutti i caroteni hanno il loro assorbimento massimo e tutte le clorofille hanno un discreto assorbimento) dell'estratto grezzo delle cellule campionate nei mesocosmi (*enclosures*) e rappresenta la composizione in pigmenti carotenoidici e clorofilliani di queste cellule nel corso di tutti gli anni in cui sono stati effettuati gli esperimenti sui mesocosmi (anni 2001-2003), con piccolissime variazioni quantitative ma non qualitative. Questi esperimenti hanno permesso di stabilire (Cantonati *et al.* 2003) che l'arricchimento con fosforo e buone condizioni di irraggiamento provocano crescita della popolazione fitoplanctonica nei mesocosmi e prevalenza del *Gs-green*, con formazione di aloni rosati, in alcune particolari condizioni. In tabella 1 sono schematizzati i principali pigmenti riconosciuti, in ordine di tempo di ritenzione crescente, i massimi di assorbimento UV-Visibile e gli ioni maggioritari degli spettri di massa ESI e/o APCI corrispondenti, tutti ottenuti on-line. Gli altri picchi cromatografici minoritari sono attribuibili principalmente a isomeri *cis-trans*. Il profilo a 450 nm risulta costituito da picchi stretti e in apparenza ben risolti, e l'accoppiamento al DAD fornisce on-line lo spettro UV-Visibile. La coeluizione della dinoxantina e della diadinoxantina, che tra l'altro hanno spettri UV-Visibile veramente simili, non è rivelata dal DAD, in

Tab. 1 - Composizione in pigmenti dei campioni esaminati mediante analisi cromatografica ad alta pressione con rivelatori DAD e MS. I picchi base, evidenziati in presenza di più ioni, sono in grassetto. A= cellule mobili di *Gs-green* nei mesocosmi; B= cisti di *Gs-green*; C= fitoplancton. *= picchi cromatografici sovrapposti.

Tab. 1 - Pigment composition of the investigated samples by HPLC-DAD-APIMS analysis. The peaks with the major relative abundance are in bold. A= motile cells of *Gs-green* in the enclosures; B= resting cells of *Gs-green*; C= phytoplankton. *= overlapped chromatographic peaks.

	Pigmento	UV-Vis (nm)	ESI+ (m/z)	APCI+ (m/z)	Campione
1	clorofilla <i>c2</i> , <i>c3</i>	446, 634	609, 611		A, B
2	peridina	474	653	631, 613, 553	A, B, C
3	fucoxantina	450	681	659, 641	A, C
4	astaxantina	478	619	597	A, B, C
5	dinoxantina	416, 440, 470	665	643, 625	A, B, C
6	diadinoxantina	420, 444, 474	605	583 , 565	A, B, C
7	adonirubina	*	603		B
8	non identificato	418, 440, 468	605		C
9	astaxantina diacetato	*	703		B
10	zeaxantina	420, 444, 472	591		B, C
11	adonirubina acetato	470	645		B
12	cantaxantina	476	589		B
13	astacene	470	615		B
14	adonirubina monoestere 22:5	470	915, 893		B
15	clorofilla <i>a</i>	432, 665	892		A, B, C
16	adonirubina monoestere 18:4	470	861 , 839		B
17	β -carotene	424, 450, 476		537	A, B, C

Tab. 2 - Mono-galattolipidi (MGDG) e di-galattolipidi (DGDG) delle cellule mobili di *Gs-green*. L'abbondanza percentuale è stata calcolata mediante integrazione delle tracce UV a 215 nm. *= circa 1%.

Tab. 2 - Mono-galactolipids (MGDG) and di-galactolipids (DGDG) of the motile cells of *Gs-green*. The percent abundance has been calculated by integration of the UV trace at 215 nm. *= about 1%.

	composto	formula	[M-H] ⁻	[MNa] ⁺	composizione degli acidi grassi	abbondanza %
MGDG		$C_{41}H_{70}O_{10}$	721	745	18:4/14:0	*
		$C_{43}H_{68}O_{10}$	743	767	18:3/16:4	*
		$C_{45}H_{66}O_{10}$	765	789	18:5/18:5	16,1
		$C_{45}H_{68}O_{10}$	767	791	18:5/18:4	20,7
		$C_{45}H_{70}O_{10}$	769	793	18:4/18:4	6,0
		$C_{45}H_{72}O_{10}$	771	795	18:4/18:3	*
		$C_{45}H_{74}O_{10}$	773	797	18:2/18:4	*
		$C_{47}H_{70}O_{10}$	793	817	20:5/18:5	6,2
		$C_{47}H_{72}O_{10}$	795	819	20:5/18:4	*
DGDG		$C_{47}H_{80}O_{15}$	883	907	18:4/14:0	*
		$C_{51}H_{76}O_{15}$	927	951	18:5/18:5	*
		$C_{51}H_{78}O_{15}$	929	953	18:5/18:4	7,3
		$C_{51}H_{80}O_{15}$	931	955	18:4/18:4	33,7
		$C_{51}H_{82}O_{15}$	933	957	18:3/18:4	*
		$C_{53}H_{82}O_{15}$	957	981	20:5/18:4	*
		$C_{53}H_{84}O_{15}$	983	1007	20:5/20:5	*

quanto esso produce uno spettro UV-Visibile media dei due. Solo la spettrometria di massa ESI o APCI in ioni positivi permette di stabilire che i due caroteni sono entrambi presenti, e che il loro peso relativo (di circa uno a undici) può essere stimato dal rapporto delle aree che spettano alla corrente ionica dei corrispondenti ioni maggioritari in APCI.

La prima osservazione riguardo ai pigmenti presenti è che, considerando i coefficienti di estinzione dei carotenoidi non molto differenti tra loro, l'astaxantina – il pigmento ritenuto responsabile dell'arrossamento del lago di Tovel da parte del *Glenodinium sanguineum* Marchesoni – è poco rappresentata.

Gli altri pigmenti, a parte il β -carotene e la clorofilla *a* ubiquitari in tutte le specie algali, sono costituiti da clorofilla *c2* e peridina – considerati *marker* dei dinoflagellati –, tracce di fucoxantina – *marker* delle diatomee e riscontrata raramente anche nei dinoflagellati –, diadinoxantina e dinoxantina – pigmenti occasionali nei dinoflagellati.

3.1.2. I galattolipidi

Il cromatogramma a 450 nm è solo una prima schermata del metabolismo secondario del *Gs-green*. Il cromatogramma a 215 nm, e ancor più la corrente ionica totale (TIC) relativa alla ionizzazione delle molecole che coeluiscono assieme ai pigmenti (dati incrociati ESI e APCI, in ioni positivi e in ioni negativi) sono molto informativi di altri metaboliti secondari presenti.

In particolare, la figura 7c si riferisce a un *range* di tempo di ritenzione tra i 23 e i 35 minuti, poco dopo l'eluizione dei carotenoidi più abbondanti. In questo tempo di ritenzione eluiscono i galattolipidi. In tabella 2 sono rappresentati i di-galattolipidi e i mono-galattolipidi del *Gs-green* nello stadio mobile dei mesocosmi del Lago di Tovel, alcuni dei quali mai precedentemente caratterizzati, ottenuti con due analisi on-line, rispettivamente LC-ESI/MS in modalità ioni negativi e LC-ESI/MS/MS in modalità ioni positivi, iniettando in entrambi i casi pochi microlitri dell'estratto grezzo.

Il galattolipide maggioritario del *Gs-green* è il di-galattolipide simmetrico 18:4/18:4.

3.1.3. Altri metaboliti secondari

La figura 7b mostra l'isoassorbanza rilevata tramite DAD nel corso dell'analisi HPLC/DAD-MS dell'estratto grezzo di *Gs-green*. Si può notare un forte assorbimento attorno ai 350 nm, dovuto a una classe di composti molto polari eluiti nei primi minuti. Cambiando colonna e fase mobile, e iniettando la prima frazione della *flash* cromatografia in fase inversa (FC RP-18), è possibile riconoscere tre composti principali, che risultano essere amminoacidi *micosporine-like* (MAAs). Questi composti

sono sostanze fotoprotettive solubili in acqua (Sinha *et al.* 1998) caratterizzate da un cromoforo costituito da cicloesenone o cicloesenimmina coniugato all'azoto di un amminoacido o di un suo imminoalcol, assorbimento massimo tra i 310 e i 360 nm, e un peso molecolare di circa 300. I composti sono stati riconosciuti (Fig. 8) in modo preliminare sulla base del loro tempo di ritenzione, comune ad altre sostanze simili nelle condizioni cromatografiche della figura, al loro caratteristico spettro UV e al loro spettro di massa ESI⁺ che permette di rilevare lo ione [M+H]⁺ rispettivamente della palitina e del palitene a *m/z* 245 e *m/z* 285, mentre il composto maggioritario è costituito dalla micosporina-alanina a *m/z* 260. Misure di ¹H-NMR sui composti successivamente purificati hanno confermato questi dati ottenuti *on-line*.

3.2. Le cisti di *Gs-green*

È noto che i dinoflagellati, sottoposti a condizioni particolari di stress, sopravvivono in forme quiescenti denominate cisti. Alcune cisti di *Gs-green*, prodotte in piccoli acquari all'interno del Museo Tridentino di Scienze Naturali, sono state analizzate nelle modalità *on-line* descritte per le cellule mobili relative. L'esiguità di materiale fornitoci (poche decine di aggregati) non ha permesso di effettuare caratterizzazioni strutturali NMR sui composti individuati, né di verificare la presenza di composti minoritari come le micosporine; tuttavia interessanti scoperte sono state fatte tramite l'analisi di pigmenti e galattolipidi.

I pigmenti principali dell'estratto dalle cisti sono riportati in tabella 1. Anzitutto bisogna notare (Fig. 9) che l'astaxantina è significativamente più abbondante nelle cisti rispetto alle forme mobili di *Gs-green*. Inoltre, il cromatogramma a 450 nm si presenta molto più complesso, in quanto contiene altri carotenoidi, che sono, da dati ESI-MS in ioni positivi: *i*) l'adonirubina; *ii*) altri probabili precursori dell'astaxantina, quali l'adonirubina-acetato, la cantaxantina ed esteri dell'adonirubina.

Tutto ciò suggerisce che la biosintesi dell'astaxantina nel *Gs-green* dipenda fortemente dal suo stato fisiologico.

3.3. Il fitoplancton del Lago di Tovel

Nell'estate 2003 la fioritura di un certo numero di forme rosse dinoflagellate ben distinguibili, se pur dominate dalle forme verdi, ha dato un impulso nuovo allo studio dell'ecofisiologia dell'alga di Tovel. L'analisi dei pigmenti del fitoplancton (Fig. 10), ottenuto da una retinata orizzontale effettuata nel lago alla fine di maggio 2003, ha rilevato una buona quantità di astaxantina e la presenza di piccole quantità di caro-

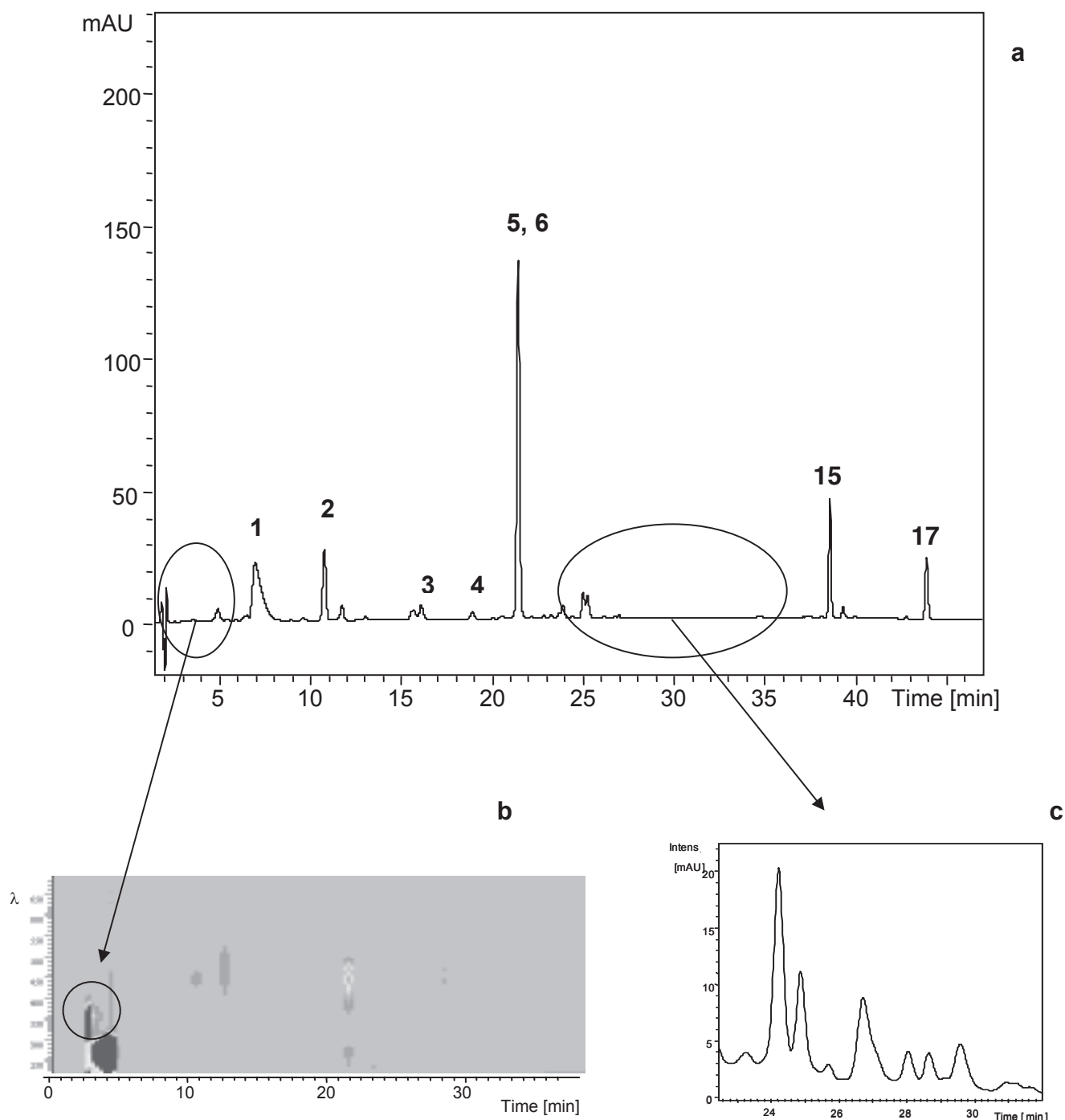


Fig. 7 - Analisi cromatografica ad alta pressione con rivelatore multiplo (DAD-MS) dei principali metaboliti secondari delle cellule mobili di *Gs-green* (sample A) raccolte dalle *enclosures* del Lago di Tovel. Metodica: gradiente lineare H_2O/CH_3OH contenente acetato d'ammonio 28 mM (colonna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm, 3,5 μm). I carotenoidi e le clorofille sono stati rivelati a 450 nm (a) e assegnati in tabella 1; il diagramma di isoassorbanza (b) evidenzia il forte assorbimento a 300-400 nm delle micosporine (MAAs); l'identificazione dei galattolipidi mostrati tramite profilo a 215 nm (c) è stato ottenuto da esperimenti di spettrometria di massa in ioni negativi e positivi (Tab. 2).

Fig. 7 - HPLC-DAD-APIMS analysis of the main secondary metabolites of the motile cells of *Gs-green* (sample A) from the *enclosures* of Lake Tovel. Methods: linear gradient H_2O/CH_3OH containing ammonium acetate 28 mM (Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 column 150 x 4,6 mm, 3,5 μm). Carotenoids and chlorophylls have been recorded at 450 nm (a) and assigned in table 1; the plot of iso-absorbance (b) points out the strong absorption between 300-400 nm of mycosporine-like aminoacids (MAAs) in the first minutes; the galactolipid profile at 215 nm (c) can be fully spread out by on-line negative and positive-ion mode ESI-MS and ESI-MS-MS (Tab. 2).

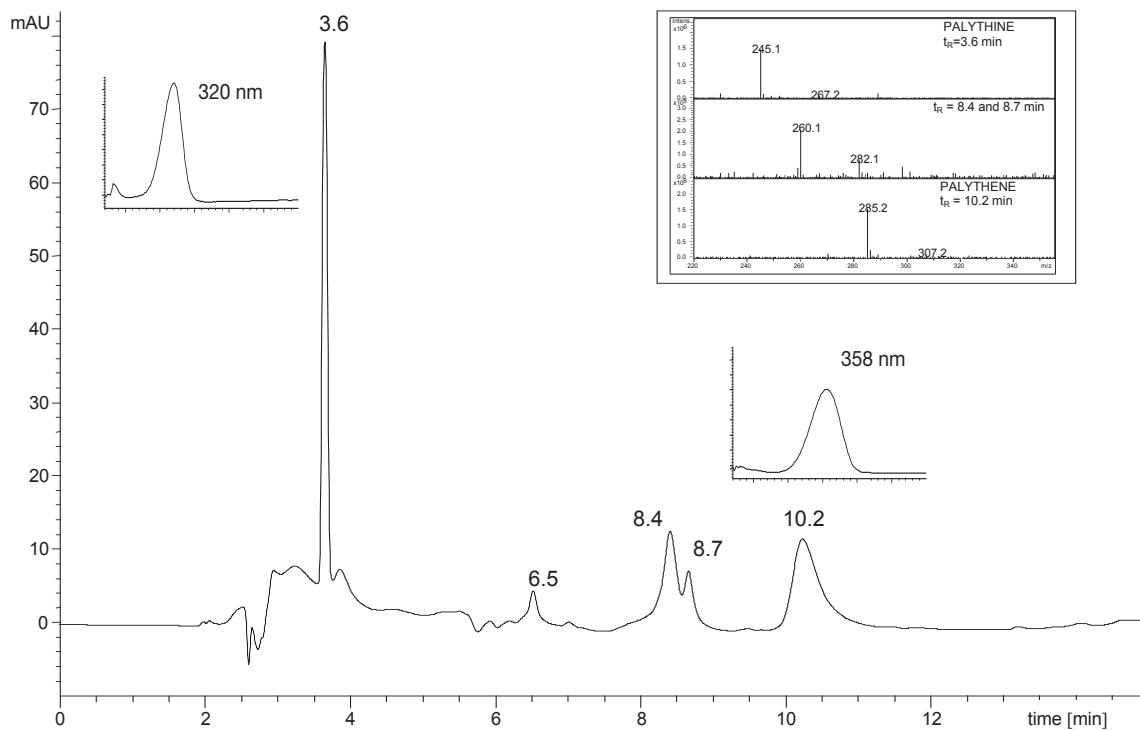


Fig. 8 - Analisi di MAAs in una frazione parzialmente purificata di estratti di *Gs-green*. Il cromatogramma è stato registrato a 320 nm mediante un gradiente H_2O/CH_3OH contenente acido formico 1% (colonna RP-18 Lichrosphere 240 x 4,6mm, 5 μm). Nei riquadri della figura sono stati riportati gli spettri UV della palitina e del palitene e gli spettri di massa in ioni positivi dei picchi principali.

Fig. 8 - Analysis of MAAs in a partially purified fraction of cellular extract of *Gs-green*. The chromatogram has been recorded at 320 nm by H_2O/CH_3OH gradient containing formic acid (Merck Lichrosphere column 240 x 4,6mm, 5 μm). UV spectra of palythine and palythene and positive-ion mass spectra of the main peaks are also shown.

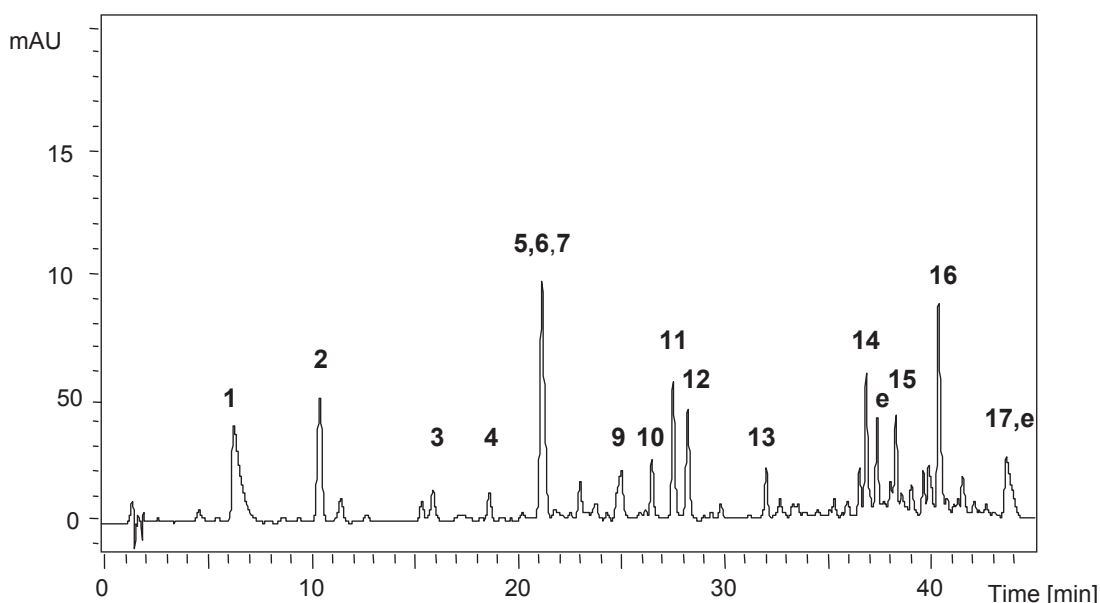


Fig. 9 - Cromatogramma a 450 nm relativo all'analisi cromatografica ad alta pressione con rivelatori DAD e MS dei pigmenti delle cisti di *Gs-green*. L'assegnazione dei picchi (Tab. 1) è stata ottenuta mediante dati spettroscopici (UV-Vis e spettrometria di massa). e = monoestere dell'adonirubina non identificato.

Fig. 9 - Chromatogram at 450 nm (HPLC-DAD-APIMS) corresponding to the pigment analysis of the resting cells of *Gs-green*. The peaks have been identified (Tab.1) by spectroscopic data (UV-Vis and mass spectrometry). e = unidentified adonirubin monoester.

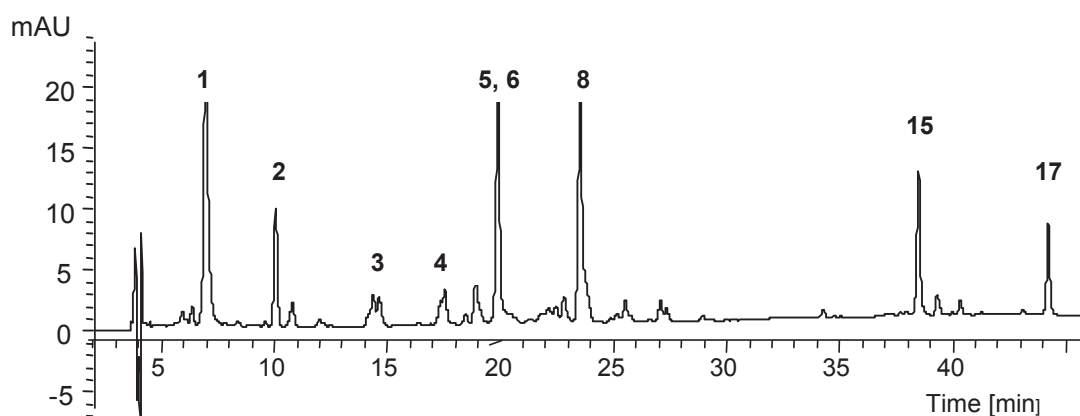


Fig. 10 - Cromatogramma a 450 nm relativo all'analisi cromatografica ad alta pressione con rivelatori DAD e MS dei pigmenti del fitoplancton ottenuto da retinata orizzontale effettuata nel Lago di Tovel nell'estate 2003. L'assegnazione dei picchi (Tab. 1) è stata ottenuta mediante dati spettroscopici (UV-Vis e spettrometria di massa).

Fig. 10 - Chromatogram at 450 nm (HPLC-DAD-APIMS) corresponding to the pigment analysis of the raw algal extracts from a horizontal net tow sample in Lake Tovel during summer 2003. The peaks have been identified (Tab.1) by spectroscopic data (UV-Vis and mass spectrometry).

teni "rossi", tra cui probabilmente l'estere diacetato dell'astaxantina (che presenta lo ione $[M+Na]^+$ a $m/z=703$ e lo ione $[M+H]^+$ a $m/z=681$) e un altro carotene rosso vicino al tempo di ritenzione della clorofilla *a* (come per gli esteri individuati nelle cisti), di cui non siamo riusciti a individuare il peso molecolare, a $t_R=38,5$ min. Gli altri pigmenti riconosciuti sono descritti in tabella 1.

4. COLTURE AXENICHE DI DINOFLAGELLATI

L'analisi dei pigmenti su cellule "verdi" o su aloni rosati di dinoflagellati provenienti dal Lago non ha trovato accordo con gli studi di Gerosa sui carotenoidi dell'alga rossa di Tovel, a parte qualche dato interessante rilevato sulle cisti di *Gs-green* e sui campioni ottenuti da retinate orizzontali di fitoplancton del lago nell'estate 2003. Un drastico mutamento di prospettiva si è avuto solo quando è stato possibile disporre di estratti organici di colture cellulari axeniche di una microalga morfologicamente simile a quella coltivata in *enclosure*, ma contenente un pattern di pigmenti molto diverso, denominata *Gs-red*.

4.1. Analisi della coltura di *Gs-red*

Solo di recente ci è stato possibile avere a disposizione poche decine di migliaia di cellule di *Gs-red* in coltura. Le cellule, recuperate sul filtro a fibra di vetro, così come precedentemente descritto, apparivano di

un colore decisamente diverso, vale a dire rosso vivo. Sono state estratte con pochissimi millilitri di acetone e in seguito di metanolo. L'estratto è stato portato a secco tramite azoto e ripreso in 50 μ l di solvente. Su questa esigua quantità di materiale prezioso è stato possibile effettuare, tramite il metodo on-line precedentemente descritto, solo alcune analisi preliminari, che comunque hanno dato alcune entusiasmanti risposte: *i*) tra i pigmenti principali di questo dinoflagellato non c'è quello usato come *marker* tassonomico del gruppo, vale a dire la peridina; *ii*) sono presenti l'astaxantina e in maggior misura altri pigmenti più apolari, che presentano un massimo di assorbimento identico a quello dell'astaxantina e un tempo di ritenzione simile a quello dei monoesteri dell'adonirubina da noi rilevati nelle cisti. Alcuni dati preliminari di spettrometria di massa e di risonanza magnetica nucleare ci portano a pensare che si tratti di esteri dell'astaxantina.

4.2. Analisi di altri dinoflagellati in coltura

In figura 11b e 11c sono riportati due cromatogrammi a 450 nm, relativi a estratti cellulari di due ceppi di dinoflagellati in coltura (rispettivamente il *Peridinium aciculiferum* Lemmermann e il *GsDK*) rapportati al profilo già descritto del *Gs-green*, proveniente dalle *enclosures*, alla stessa lunghezza d'onda (11a). Come si può notare, a parte le intensità relative, i cromatogrammi sono molto simili e le assegnazioni fatte per i picchi principali del cromatogramma del *Gs-green* riportati in tabella 1 valgono anche per questi altri dinoflagellati.

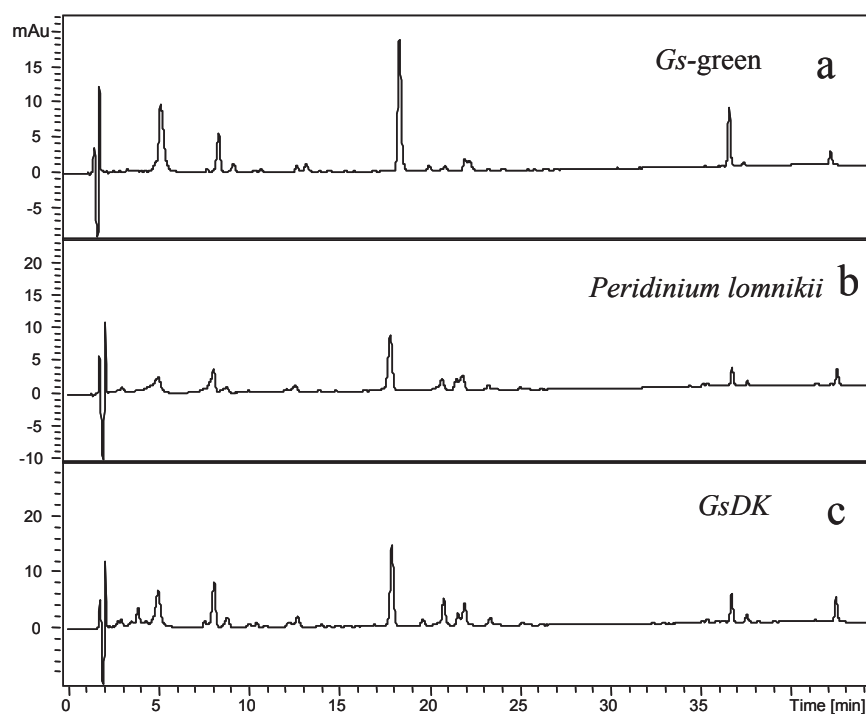


Fig. 11 - Cromatogramma a 450 nm relativo all'analisi cromatografica ad alta pressione con rivelatori DAD e MS dei pigmenti presenti in due dinoflagellati in coltura (b) e (c) rapportati al profilo del *Gs-green* (a).

Fig. 11 - Chromatogram at 450 nm (HPLC-DAD-APIMS) corresponding to the pigment analysis of two cultured dinoflagellate species (b) and (c) compared to the *Gs-green* profile (a).

5. CONCLUSIONI

Il nostro lavoro si è avvalso della forte interazione con diverse unità di ricerca coinvolte nel progetto SALTO e, fatta eccezione per i lavori del prof. Vittorio Gerosa degli anni '60, rappresenta l'unico contributo per la comprensione del fenomeno dell'arrossamento del Lago di Tovel dal punto di vista chimico. Gli Autori del presente contributo non pensano di poter esser tacciati di "riduzionismo" affermando che questo approccio risulta imprescindibile per una rigorosa comprensione di questo complesso fenomeno biologico.

Il lavoro si è svolto in tre fasi temporali ben distinte, quasi coincidenti con le annate del progetto stesso. Nella prima (2001-2002) si è lavorato intensamente sui *Gs-green* di *enclosures* e loro cisti. Nonostante il grande successo avuto nel far crescere le microalghe negli *enclosures*, è apparso subito chiaro che non si sarebbe potuto disporre di "glenodini rossi" (specie in cui i pigmenti carotenoidici dominano i pigmenti clorofilliani), bensì di "glenodini verdi" (specie in cui i pigmenti clorofilliani dominano i pigmenti carotenoidici). In ogni caso, il riconoscimento di questi carotenoidi da *Gs-green* ha rappresentato un primo stadio fondamentale non solo per la messa a punto delle

nostre metodiche analitiche, ma soprattutto perché sono stati individuati importanti composti considerati "intermedi" nella biosintesi di carotenoidi *red-like*. In particolare, aver trovato quantità significative di questi carotenoidi nella fase di incistamento suggerisce che la loro biosintesi (almeno nel *Gs-green*) dipenda fortemente dallo stato fisiologico delle cellule.

Nella seconda fase (2003) si sono indagati, *inter alia*, campioni di fitoplancton del lago raccolti con retinate orizzontali e verticali. Grazie alle metodiche ormai molto raffinate messe a punto negli anni precedenti e grazie soprattutto agli sviluppi seguiti alla torrida estate 2003, dall'estratto organico di una retinata orizzontale effettuata nella Baia Rossa abbiamo potuto rilevare un'apprezzabile quantità di astaxantina, che confermava la presenza di una discreta presenza di glenodini della forma rossa (rapporto di astaxantina/diadinoxantina = 0,2; da notare che in un tipico campione da *enclosure* il rapporto è normalmente di 0,02).

Nell'ultima fase delle ricerche (2004) il nostro interesse si è maggiormente concentrato su colture di laboratorio (IASMA) della specie *Gs-DK* e soprattutto *Gs-red*. In particolare, le nostre analisi eseguite su minute quantità di colture cellulari di *Gs-red* suggeriscono la presenza di un *pattern* di pigmenti carotenoi-

dici significativamente diverso da quello della specie *Gs-green*. In particolare, queste cellule producono in rese elevate non tanto l'astaxantina, ma suoi esteri alchilici a lunga catena le cui strutture sono in corso di definizione. La presenza di questi pigmenti nei globuli superficiali della membrana cellulare rende conto dell'intensa colorazione rossa di queste cellule e del fatto che in questa specie il rapporto carotenoidi/clorofilla è un valore decisamente elevato.

BIBLIOGRAFIA

- Baldi E., 1938 - Relazione preliminare sulle ricerche al lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 19: 247-339.
- Baldi E., 1941 - Ricerche idrobiologiche sul lago di Tovel. *Mem. Museo St. Nat. Venezia Trid.*, 6: 1-297.
- Cantonati M., Tardio M., Tolotti M. & Corradini F., 2003 - Blooms of the dinoflagellate *Glenodinium sanguineum* obtained during enclosure experiments in Lake Tovel (N. Italy). *J. Limnol.*, 62: 79-87.
- Diehl W.K., Herling H., Riedl I. & Heinz E., 1995 - ¹³C-NMR analysis of the positional distribution of fatty acids in plant glycolipids. *Chem. Phys. Lipids*, 77: 147-153.
- Dodge J.D., Mariani P., Paganelli A. & Trevisan R., 1987 - Fine structure of the red-bloom dinoflagellate *Glenodinium sanguineum* from Lake Tovel (N. Italy). *Arch. Hydrobiol.*, 78, Suppl.: 125-138.
- Flaim G., Hansen G., Moestrup O., Corradini F. & Borghi B., 2004 - Reinterpretation of the dinoflagellate '*Glenodinium sanguineum*' in the reddening of Lake Tovel, Italian Alps. *Phycologia*, 43: 737-743.
- Frassanito R., Cantonati M., Tardio M. & Mancini I., 2005 - On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria by combined liquid chromatography-photodiode array detection-mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. A*, 108: 33-42.
- Gerosa V., 1959 - I Carotinoidi e l'arrossamento del Lago di Tovel. *Natura Alpina*, 10: 86-91.
- Gerosa V., 1961 - La natura chimica delle sostanze che provocano l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 38: 173-181.
- Gerosa V., 1966 - La natura chimica delle sostanze che provocano l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, sez. B, 13: 145-158.
- Gerosa V., 1970 - La natura chimica delle sostanze che provocano l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, sez. B, 17: 3-28.
- Gounaris K., Whitford D. & Barber J., 1983 - The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. *FEBS Letters*, 163: 230-234.
- Guella G., Frassanito R. & Mancini I., 2003 - A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17: 1982-1994.
- Johansen J.E., Swec W.A., Liaaen-Jensen S. & Haxo F.T., 1974 - Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochemistry*, 13: 2261-2271.
- Mancini I., Guella G., Defant A., Candenas M.L., Armesto C.P., Depentori D. & Pietra F., 1998 - Polar metabolites of the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which is spreading in the Mediterranean Sea. Glycoglycerolipids and stable enols (.alpha.-keto esters). *Helv. Chim. Acta*, 81: 1681-1691.
- Murakami N., Morimoto T., Inamura H., Nagatsu A. & Sakakibara J., 1994 - Enzymatic transformation of glycerolipids into sn-1 and sn-2 lysoglyceroglycolipids by use of *Rhizopus arrhizus* lipase. *Tetrahedron*, 50: 1993-2002.
- Murakami A., Nakamura Y., Koshimizu K. & Ohigashi H., 1995 - Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. *J. Agric. Food. Chem.*, 43: 2779-2783.
- Sinha R.P., Klisch M., Gröniger A. & Häder D.P., 1998 - Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, 47: 83-94.
- Strain H.H., Svec W.A., Aizetmuller K., Grandolfo M., Katz J.J., Kiosen H., Norgard S., Liaaen-Jensen S., Haxo F.T., Wegfahrt P. & Rapoport H., 1971 - Peridinin, the dinoflagellate Carotenoid. *J. Am. Chem. Soc.*, 93: 1823-1825.