

- ¹³ W. C. SCHNEIDER AND J. ROTHERHAM, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 948.
- ¹⁴ R. OKAZAKI AND T. OKAZAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 470; personal communication.
- ¹⁵ E. CHAIN, *Biochem. J.*, 33 (1939) 407.
- ¹⁶ E. A. ZELLEK, in *The Enzymes*, Vol. I, Part 2, Academic Press, Inc., New York, 1951, p. 285.
- ¹⁷ L. SHUSTER AND N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 535.
- ¹⁸ T. SUZUKI, to be published.
- ¹⁹ J. M. GULLAND, *Biochem. J.*, 32 (1938) 590.
- ²⁰ T. SUZUKI AND S. IWANAGA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 78 (1958) 354.
- ²¹ S. UZAWA, *J. Biochem. (Tokyo)*, 15 (1932) 19.
- ²² L. A. HEPPEL AND R. J. HILMOE, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 665.
- ²³ W. C. SCHNEIDER AND R. L. POTTER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 94 (1957) 798.
- ²⁴ Y. SUGINO, unpublished.
- ²⁵ J. ROTHERHAM AND W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 853.
- ²⁶ R. OKAZAKI, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1 (1959) 34.

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 425-434

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS CHIMIQUES SUR LA CAROTÉNOGÉNÈSE DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

JEAN VILLOUTREIX

Laboratoire de Chimie, Faculté de Pharmacie de Nancy* (France)*

(Reçu le 2 septembre, 1959)

SUMMARY

The influence of various chemical agents on the carotenogenesis of Rhodotorula mucilaginosa

The action of phenol, phenylethylacetamide, acenaphthene, naphthalene, phenanthrene, streptomycin, and diphenylamine on the carotenogenesis of *Rh. mucilaginosa* was studied; where the action was inhibitory, it was accompanied by a decline in the growth of the cultures: a fact that indicates the complex nature of the phenomenon.

Biphenyl incorporated in the culture medium at a concentration of 50 µg/ml has practically no effect on the growth of *Rh. mucilaginosa*, and permits the obtention of a white yeast. Among the diphenyl derivatives studied, only the asymmetrically substituted ones inhibited the carotenogenesis.

INTRODUCTION

Une des méthodes permettant d'aborder le mécanisme de la biosynthèse des caroténoïdes, réside dans l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Ce procédé largement employé par de nombreux auteurs et chez divers microorganismes¹ ne semble pas,

* Directeur: Professeur F. KAYSER.

en ce qui concerne les levures rouges, avoir connu une pareille extension. Nous rapportons ici les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de l'inhibition de la caroténogénèse de *Rh. mucilaginosa*.

Dans nos expériences nous nous sommes adressé d'une part à des agents dont l'action inhibitrice sur la biosynthèse des caroténoïdes était reconnue (phénol, diphenylamine, etc....) d'autre part, à des corps pour lesquels nous avons mis en évidence une action anticaroténogène.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et techniques

Microorganisme: La levure utilisée au cours de ce travail a été isolée accidentellement à partir d'une levure de brasserie récoltée dans des filtres-presses.

Il s'agit d'une levure appartenant à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa**.

Techniques de culture: Une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu est ensemencée à partir d'une culture sur gélose inclinée. La fiole est portée dans un thermostat à 30°, l'aération est réalisée par agitation magnétique.

Le milieu utilisé est entièrement synthétique, en voici la composition:

Thiamine (chlorhydrate) 0.4 mg; riboflavine 0.2 mg, acide nicotinique 5 mg, acide *p*-aminobenzoïque 0.3 mg, pyridoxal 1 mg, pantothénate de calcium 0.5 mg, méso-inositol 50 mg, biotine 0.002 mg, L-histidine (monochlorhydrate) 10 mg, L-tryptophane 20 mg, DL-méthionine 20 mg, sulfate d'ammonium 3 g, phosphate monopotassique 2 g, sulfate de magnésium 7 H₂O 0.25 g, chlorure de calcium 6 H₂O 0.25 g, chlorure de manganèse 4 H₂O 1 mg, sulfate zinc 7 H₂O 1 mg, acide borique 1 mg, chlorure ferrique 0.5 mg, sulfate de cuivre 5 H₂O 1 mg, iodure de potassium 1 mg, saccharose 20 g, eau distillée Q.S.p 1000 ml.

Sterilisation 20 min à l'autoclave à 120°. pH 5.2.

Incorporation des inhibiteurs au milieu de culture: Pour les corps insolubles dans l'eau, nous avons utilisé comme "solubilisant" le Tween 80 dont quelques essais préliminaires nous ont montré la parfaite innocuité sur la croissance et la pigmentation de *Rh. mucilaginosa* dans nos conditions expérimentales.

Nous avons pu ainsi obtenir des liquides contenant jusqu'à 2 mg/ml d'hydrocarbure qui, dans la plupart des cas restaient limpides.

Estimation de la croissance: Elle a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Coleman junior, par la mesure de la densité optique de la suspension à 610 mμ.

RÉSULTATS

Phénol

TURIAN² a mis en évidence son action puissante sur la caroténogénèse de *Mycobacterium phlei*; il ne semble pas toutefois qu'il s'agisse là d'une propriété générale puisque le phénol est sans action, par exemple, sur *Phycomyces*³. De plus la souche de *Mycobacterium* utilisée par TURIAN paraît avoir présenté une sensibilité particulière⁴.

Nous avons essayé ce corps sur *Rh. mucilaginosa*, les résultats ont été difficiles à interpréter car il ne nous a pas été possible de dissocier l'action sur la croissance de celle sur la caroténogénèse.

* Le Centraal Bureau voor Schimmelcultures-Yeast Division à Delft a confirmé l'identité de cette souche avec *Rhodotorula mucilaginosa* (Jørgensen) Harrison.

Phényléthylacétamide

Ce composé commercialisé sous le nom d'hypostérol est utilisé en thérapeutique comme hypocholestérolémiant. Malgré de nombreux travaux, le mode d'action de cette amide reste hypothétique, il semble cependant que ce soit la synthèse de l'acétyl CoA ou de l'acétoacétyl CoA qui soit inhibée⁵. Nous avons pensé que l'hypostérol pourrait être un inhibiteur de la caroténogénèse si, comme cela a été avancé, l'acétate en était bien le précurseur lointain.

En fait pour des concentrations inférieures à 1 mg/ml la croissance et la caroténogénèse ne sont pratiquement pas perturbées. Pour des concentrations de 1 à 2 mg/ml l'inhibition de la caroténogénèse va de pair avec celle de la croissance.

La levure est à la fois moins abondante et moins colorée rendant donc difficile l'analyse du phénomène.

Hydrocarbures à noyaux condensés

ARK⁶ étudiant l'action du naphthalène, de l'acénaphène et de leurs dérivés sur la chromogénèse de *Corynebacterium michiganense* et de *Xanthomonas juglandis*, semble avoir obtenu dans quelques cas de véritables mutations tandis que dans les autres cas, il s'agit vraisemblablement d'une simple inhibition de la chromogénèse.

En utilisant ces observations comme idée directrice, nous avons pensé tester l'action de divers hydrocarbures sur la caroténogénèse: naphthalène, acénaphène, phénanthrène. L'action sur la croissance a été relativement faible comme l'indique le Tableau I.

TABLEAU I

ACTION SUR LA CROISSANCE DE *Rh. mucilaginosa* D'HYDROCARBURES À NOYAUX CONDENSÉS

Inhibiteur 200 µg/ml	Densité optique $\times 100$, mesurée au bout de						
	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	24 h	32 h
Témoin	50	64	67	83	88	96	105
Acénaphène	32	41	54	64	75	89	105
Naphtalène	38	49	63	73	83	93	103
Phénanthrène	45	57	70	79	86	95	107

L'acénaphène non seulement n'a manifesté aucune action inhibitrice mais a toujours conduit, après plusieurs essais à une levure plus colorée que le témoin même pour des concentrations atteignant $4 \cdot 10^{-3}$.

Le naphthalène retarde simplement l'apparition de la pigmentation qui ne commence à être visible qu'à partir de la 16ème heure lorsque la densité optique de la culture atteint déjà 63 alors que la coloration du témoin est déjà parfaitement perceptible pour une densité optique de 30 environ. En fin de croissance, la levure ayant poussé en présence de naphthalène présente une teinte et une intensité de coloration comparables à la culture témoin.

Le phénanthrène, comme le naphthalène, retarde l'apparition de la pigmentation mais la levure présente en fin de croissance une coloration rose orangé que nous n'avions jamais obtenue jusqu'alors.

Ces résultats bien que présentant un certain intérêt, puisque deux des trois

corps essayés ont certainement modifié la caroténogénèse, ne nous ont pas paru assez nets pour justifier, pour l'instant, une étude plus approfondie car nous avons trouvé dans la série du biphényle des inhibiteurs beaucoup plus actifs.

Streptomycine

Chez *Phycomyces blakesleeanus*, la streptomycine agit sélectivement sur la caroténogénèse mais uniquement si la source azotée est l'asparagine. En effet, si on remplace l'asparagine partiellement ou totalement par un sel d'ammonium la streptomycine n'agit plus. De même dans un milieu contenant de l'acétate sans glucose, la streptomycine inhibe d'une façon identique la croissance et la caroténogénèse de *Phycomyces blakesleeanus*, si bien que la concentration en pigment reste constante⁷.

Chez *Rhodospirillum rubrum* bien qu'inhibant la croissance, cet antibiotique n'a pratiquement pas d'action sur la pigmentation⁸.

Par contre, chez une Euglène sp., la destruction des chloroplastes par la streptomycine est accompagnée d'une inhibition marquée mais non totale de la synthèse des caroténoïdes⁹.

L'utilisation de la streptomycine comme inhibiteur de la pigmentation des levures rouges a fait l'objet d'une étude de BERTOSI ET CIFERRI chez *Rh. rubra*¹⁰. Ces auteurs trouvent que la streptomycine, à des concentrations allant de 10^{-5} à 10^{-3} , est sans action sur la croissance comme sur la teneur en torularhodine, torulène, β -carotène, et γ -carotène.

Les expériences que nous avons réalisées avec *Rh. mucilaginosa* montrent que cette levure est très peu sensible à la streptomycine ce qui ne nous a pas surpris, les levures étant très résistantes aux antibiotiques. Que la source azotée soit sous forme d'asparagine ou de sulfate d'ammonium, ni la croissance, ni la caroténogénèse n'ont été modifiées pour des concentrations en antibiotique allant de $2 \cdot 10^{-5}$ à $2 \cdot 10^{-2}$.

Diphénylamine (DPA)

KARASCH, CONWAY ET BLOOM¹¹ avaient montré que la chromogénèse est inhibée chez plusieurs bactéries et champignons par DPA. TURIAN¹² reprenant ces observations montre que cette substance, à la concentration de 1/20,000 à 1/35,000 inhibe la caroténogénèse de *Mycobacterium phlei*. GOODWIN¹³ a étudié l'action de cette amine sur *Phycomyces blakesleeanus* et a pu montrer que la production des α -, β - et γ -carotènes et celle du lycopène est pratiquement abolie tandis que la teneur en phytoène, phytofluène, ζ -carotène et neurosporène est nettement augmentée. Bien que de nombreux chercheurs aient utilisé DPA pour inhiber la caroténogénèse, le mode d'action de ce composé est resté inconnu; d'ailleurs, le métabolisme des caroténoïdes n'est probablement pas seul à être perturbé car, dans bien des cas, la croissance a été fortement diminuée sinon totalement empêchée. GOODWIN¹⁴ signale par exemple l'inhibition totale de la croissance de *Chlorella vulgaris* par DPA à 1/280,000.

A notre connaissance, peu de travaux signalent l'utilisation de DPA dans l'étude de la caroténogénèse chez les levures appartenant au genre *Rhodotorula*.

SLECHTA *et al.*¹⁵ ont montré que dans le cas de *Rhodotorula gracilis*, DPA à la concentration de $4.5 \cdot 10^{-5}$ inhibe totalement la synthèse des pigments.

Pour *Rhodotorula rubra*, H. WHITTMAN¹⁶ trouve également une inhibition de la caroténogénèse par DPA sans que la croissance soit influencée pour une concentration

de 1 % en inhibiteur (!). La levure dans ce cas présente des cellules beaucoup plus grandes que les témoins.

Nous avons de notre côté, testé la sensibilité de *Rhodotorula rubra** à DPA, la croissance est très fortement diminuée pour des concentrations de 4 à $5 \cdot 10^{-5}$.

Sur notre souche de *Rh. mucilaginosa*, DPA exerce une puissante action anti-caroténogène, dès la concentration de 10^{-5} ; l'inhibition ne semble totale que pour des concentrations de 4 à $5 \cdot 10^{-5}$.

Le Tableau II montre que l'inhibition de la caroténogénèse est accompagnée d'une inhibition de la croissance ce qui prouve que DPA agit sur plusieurs mécanismes.

Plusieurs auteurs ont obtenu, dans des conditions différentes, la levée de l'inhibition produite par DPA.

Les cultures de *Phycomyces blakesleeianus* en présence de DPA voient leur taux de β -carotène redevenir sensiblement normal si on ajoute au milieu, de la riboflavine ou de l'acide adénylique de muscle; l'acide adénylique de la levure est sans action³.

TABLEAU II
ACTION DE DPA SUR LA CROISSANCE DE *Rhodotorula mucilaginosa*

Concentration en DPA en $\mu\text{g/ml}$	Densité optique $\times 100$, mesurée au bout de									
	15 h	17 h	19 h	21 h	24 h	40 h	43 h	62 h	65 h	72 h
0	66	77	85	95	103	120				
10	48	62	73	83	93	114				
20	21	33	48	63	79	110				
50	0	0	0	1	4	37	43	59	56	60

Dans le cas de *Rhodospirillum rubrum* par contre, la riboflavine et l'adenosine-5-phosphate sont incapables de ramener la caroténogénèse. Cependant l'action de DPA n'est pas irréversible car si après élimination de cet inhibiteur par des lavages, on place la masse bactérienne dans un tampon phosphate, une pigmentation voisine de la normale peut être obtenue aussi bien en anaérobiose en présence de lumière qu'en aérobiose dans l'obscurité^{17, 18}.

Rhodotorula gracilis représente un cas bien différent¹⁵: si après croissance en présence de DPA, cette levure est lavée puis placée dans un milieu ne contenant ni DPA, ni source azotée, la caroténogénèse reste inhibée alors que la levure normale donne bien dans les mêmes conditions une nette synthèse de caroténoïdes. Si au milieu de culture précédent, on rajoute une source azotée et laisse la levure proliférer, cette dernière recouvre peu à peu sa capacité de synthétiser les pigments; *Rhodotorula rubra* semble se comporter d'une façon semblable¹⁶.

Nous avons également tenté pour *Rhodotorula mucilaginosa* de lever l'inhibition de la caroténogénèse provoquée par DPA.

Une culture ayant poussé sur 20 $\mu\text{g/ml}$ de DPA est lavée 4 fois avec du phosphate monopotassique M/15 puis remise en suspension dans ce tampon. Après 20 h d'aération intense la culture reste blanche; dans ces conditions, la synthèse endogène des pigments n'est donc pas réalisable. L'apport d'une source exogène de carbone sous forme de saccharose ou de glucose n'a pas donné plus de résultat.

Il a fallu pour obtenir la levée d'inhibition permettre à la levure de se reproduire

* Souche CBS No. 109 fournie par le Centraal Bureau voor Schimmencultures à Delft.

par repiquage sur son milieu habituel et même dans ces conditions la caroténogénèse reste très faible jusqu'au 5ème repiquage environ. Ce fait laisse penser que DPA reste très fortement fixée sur les cellules et la synthèse des pigments n'a lieu qu'au fur et à mesure de la dilution de l'inhibiteur par suite de la multiplication cellulaire. De sorte que nous n'assistons pas à une levée d'inhibition mais à une dilution de l'inhibiteur jusqu'à atteindre la teneur où il devient inactif.

Biphényle

L'action de ce composé sur la caroténogénèse de *Rhodotorula mucilaginosa* est intense car pour des concentrations de l'ordre de 20 $\mu\text{g/ml}$ de milieu, on obtient déjà une levure à peine colorée* dont la croissance est cependant identique à celle du témoin.

Pour une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ la levure obtenue est aussi blanche que celle résultant de l'action de DPA et ce, pour des concentrations de même ordre de ces 2 agents. Le biphényle, dans nos conditions expérimentales, présente de plus l'avantage qu'à concentration égale, la croissance est inchangée, en tous cas beaucoup moins affectée que dans le cas de l'emploi de la diphénylamine (voir Tableaux II et III).

TABLEAU III
ACTION DU BIPHÉNYLE SUR LA CROISSANCE DE *Rhodotorula mucilaginosa*

Concentration du biphényle en $\mu\text{g/ml}$	Densité optique $\times 100$, mesurée au bout de								
	11 h	13 h	14 h	15 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h
0	22	30	36	42	50	68	81	90	103
50	13	21	27	35	41	57	72	84	92
100	13	21	26	36	41	59	74	84	93
140	11	18	23	31	36	53	67	78	86
200	11	18	22	30	37	52	67	78	86

Dérivés du biphényle

Devant ce résultat encourageant, il nous a paru intéressant de voir si l'activité du biphényle pouvait être encore exaltée par l'introduction de substituants dans la molécule.

Les hydrocarbures s'oxydant, dans les milieux biologiques, généralement en phénols nous pouvions penser que le biphényle est transformé également en dérivés phénoliques par la levure. En ajoutant ces derniers au milieu de culture, nous devons constater une action beaucoup plus marquée que celle de l'hydrocarbure.

D'un autre côté, bien que le mécanisme d'action de DPA ne soit pas connu il est probable que la fonction amine n'est pas étrangère au phénomène, aussi avons nous pensé que les aminobiphényles pouvaient présenter une action supérieure à celle de l'hydrocarbure lui-même.

Nous avons soumis à l'expérimentation les composés suivants: 2-hydroxybiphényle, 2,2'-dihydroxybiphényle, 4-hydroxybiphényle, acide diphénique, 4-amino-

* A l'encontre des observations de ARK⁶ et malgré de très nombreux isollements et contrôles microscopiques, nous n'avons jamais constaté de modification de notre souche, pouvant laisser supposer que les hydrocarbures ou dérivés employés dans nos expériences, avaient provoqué des mutations.

biphényle, 4,4'-diaminobiphényle et enfin 4,4'-diamino-3,3'-diméthylbiphényle (tolidine).

Nous avons suivi l'action de ces corps en fonction de la concentration sur la caroténogénèse et sur la croissance de la levure.

Nos résultats sont résumés dans le Tableau IV. La pigmentation est exprimée par +++ pour une levure possédant une intensité de pigmentation identique à celle de la souche mère, cultivée dans les mêmes conditions, mais en l'absence d'inhibiteur.

TABLEAU IV
ACTION SUR LA CROISSANCE ET LA CAROTÉNOGÉNÈSE DE *Rhodotorula mucilaginosa*, DES
DÉRIVÉS DU BIPHÉNYLE

Inhibiteur	Concentration en µg/ml	Pigmentation	Densité optique au bout de 24 h
2-hydroxybiphényle	5	+	105
	10	o	100
	20	o	89
	50	o	67
2,2'-dihydroxybiphényle	20	+++	95
	50	+++	80
	100	++	70
4-hydroxybiphényle	10	o	95
	20	o	62
	50	o	8
	100	o	6
Acide diphenique	50	+++	100
	100	+++	100
	200	+++	100
	400	+++	100
4-aminobiphényle	20	+	100
	50	o	85
	100	o	42
4,4'-diaminobiphényle	100	+++	125
	200	+++	125
Tolidine	20	+++	115
	50	+++	115
	100	+++	110
	200	+++	120
	300	+++	120
	500	+++	125
Témoin	---	+++	110

Il en ressort clairement que certains dérivés du biphényle possèdent un pouvoir inhibiteur élevé de la caroténogénèse dans nos conditions expérimentales. Ce sont: le 2-hydroxybiphényle, le 4-hydroxybiphényle, le 4-aminobiphényle.

D'autres dérivés sont totalement dépourvus d'action sur la pigmentation et certains d'entre eux semblent favoriser très légèrement la croissance de la levure.

Ce sont: le 2,2'-dihydroxybiphényle, l'acide diphénique, le 4,4'-diaminobiphényle, la tolidine.

D'après ces résultats, il est possible de voir que parmi les composés du biphényle essayés, tous les dérivés possédant une molécule symétrique sont dépourvus d'action sur les deux phénomènes: croissance et caroténogénèse alors que tous les dérivés dissymétriques possèdent une puissante action anticaroténogène. Il s'agit peut-être là d'une coïncidence qu'il est prématuré de généraliser.

Nous avons tenté de lever l'action inhibitrice des dérivés du biphényle en mettant à profit l'observation de WEST¹⁹ que, chez le rat, la toxicité du biphényle est diminuée par addition de méthionine au régime. Bien que cette action soit indirecte, nous avons testé la méthionine et la cystéine à des concentrations allant de 40 à 200 µg/ml.

De tous nos essais, seule l'action de 4-aminobiphényle est abolie par l'addition de cystéine mais non de méthionine au milieu de culture.

RÉSUMÉ

L'action du phénol, de la phényléthylacétamide, de l'acénaphène, du naphthalène, du phénanthrène, de la streptomycine, de la diphénylamine, sur la caroténogénèse de *Rh. mucilaginosa* a été étudiée: lorsqu'une action inhibitrice s'exerce, elle s'accompagne d'une diminution de la croissance des cultures ce qui indique la complexité du phénomène.

Le biphényle, incorporé dans le milieu de culture à la concentration de 50 µg/ml, n'agit pratiquement pas sur la croissance de *Rh. mucilaginosa* et permet d'obtenir une levure blanche. Parmi les dérivés du biphényle étudiés, seuls ont présenté une action inhibitrice de la caroténogénèse, ceux qui sont substitués de façon dissymétrique.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ T. W. GOODWIN, *Ann. Rev. Biochem.*, 24 (1955) 511.
- ² G. TURIAN, *Helv. Chim. Acta.*, 34 (1951) 1060.
- ³ T. W. GOODWIN, M. JAMIKORN ET J. S. WILLMER, *Biochem. J.*, 53 (1953) 531.
- ⁴ T. W. GOODWIN ET M. JAMIKORN, *Biochem. J.*, 62 (1956) 269.
- ⁵ P. MONNIER, R. HUGUET, J. GRAS ET C. JONQUIÈRES, *Travaux soc. pharm. Montpellier*, 18 (1958) 88.
- ⁶ P. A. ARK, *J. Bacteriol.*, 61 (1951) 293.
- ⁷ T. W. GOODWIN, L. A. GRIFFITH'S ET V. V. MODI, *Biochem. J.*, 62 (1956) 259.
- ⁸ T. W. GOODWIN ET H. G. OSMAN, *Biochem. J.*, 53 (1953) 541.
- ⁹ T. W. GOODWIN ET M. JAMIKORN, *J. Protozool.*, 1 (1954) 216.
- ¹⁰ F. BERTOSSI ET O. CIFFERI, *Nuovi ann. igiene e microbiol.*, 8 (1957) 548.
- ¹¹ M. S. KARASCH, E. A. CONWAY ET W. BLOOM, *J. Bacteriol.*, 32 (1936) 533.
- ¹² G. TURIAN, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1988.
- ¹³ T. W. GOODWIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 550.
- ¹⁴ T. W. GOODWIN, *Experientia*, 10 (1953) 213.
- ¹⁵ L. SLECHTA, O. GABRIEL ET O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Nature*, 181 (1958) 268.
- ¹⁶ H. WITTMAN, *Arch. Mikrobiol.*, 25 (1956) 373.
- ¹⁷ T. W. GOODWIN, *J. Sci. Food Agr.*, 4 (1953) 218.
- ¹⁸ S. L. JENSEN, G. COHEN-BAZIRE, T. O. M. NAKAYAMA ET R. Y. STANIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 477.
- ¹⁹ H. D. WEST, J. R. LAWSON, I. H. MILLER ET G. R. MATHURA, *Arch. Biochem.*, 60 (1956) 14.