

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Novembre 1969, tome 117.)

IMPORTANCE RELATIVE DE LA GLYCOLYSE
ET DE LA VOIE DES PENTOSE-PHOSPHATES DANS
L'OXYDATION AÉROBIE DU GLUCOSE
PAR *LIPOMYCES STARKEYI*

PAR

M. RAIMBAULT

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

Fonds Documentaire ORSTOM

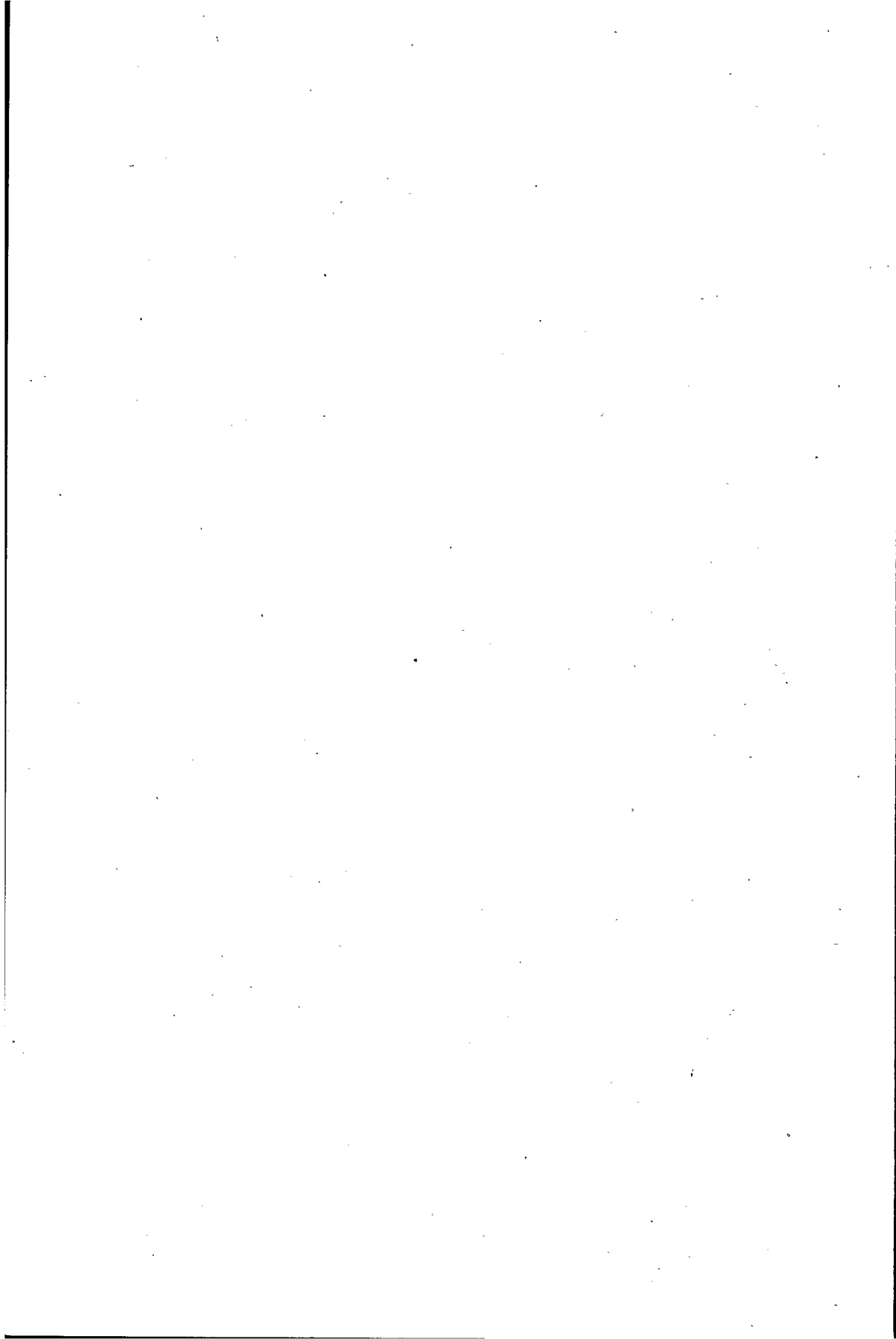


010018998

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: B* 18998

Ex: unique



IMPORTANCE RELATIVE DE LA GLYCOLYSE
ET DE LA VOIE DES PENTOSE-PHOSPHATES
DANS L'OXYDATION AÉROBIE DU GLUCOSE
PAR *LIPOMYCES STARKEYI*

PAR

M. RAIMBAULT

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* »
(N° d'ordre 4417. — Extrait Novembre 1969. — Tome 117, pp. 708-716.)

IMPORTANCE RELATIVE DE LA GLYCOLYSE ET DE LA VOIE DES PENTOSE-PHOSPHATES DANS L'OXYDATION AÉROBIE DU GLUCOSE PAR *LIPOMYCES STARKEYI* (*)

par M. RAIMBAULT (**)

(Laboratoire de Chimie Bactérienne, Centre National de la Recherche
Scientifique, Marseille)

SUMMARY

RELATIVE IMPORTANCE OF GLYCOLYSIS AND PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY
IN AEROBIC OXIDATION OF GLUCOSE BY *Lipomyces starkeyi*

1. IDENTIFICATION AND ESTIMATION OF ENZYMES.

Hexokinase, phosphofructokinase, fructose-diphosphate aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and transketolase have been found in extracts of aerobic cultures of *L. starkeyi* containing glucose as source of carbon. However, the level of the first two enzymes is relatively low.

In presence of 4 mM arsenite the extracts catalyze the production of pyruvate from 3-phosphoglycerate, fructose-1,6-diphosphate, glucose-6-phosphate or ribose-5-phosphate.

2. EXPERIMENTS WITH CELL SUSPENSIONS.

Four mM arsenite causes a 64 % inhibition of oxygen respiration in presence of glucose but it does not affect the endogenous respiration. When the cells are incubated aerobically with glucose in presence of 5 mM arsenite, a large amount of pyruvate accumulates.

To determine the participation of different metabolic pathways glucose specifically labeled in carbon 1, 2 and 6 was used. The radioactivity of pyruvate extracted as its 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative was measured. The following mean distribution of activity was calculated from the data obtained : pentose phosphate pathway, 52,8 % ; glycolysis, 22,5 % ; pathway not yielding glyceraldehyde-3-phosphate, 24,7 %. It is evident that the pentose phosphate cycle has an important role in aerobic degradation of glucose by *L. starkeyi*.

INTRODUCTION

Lipomyces starkeyi est une levure aérobie stricte dont le métabolisme a été peu étudié jusqu'ici. On sait cependant qu'elle accumule des quantités élevées de lipides intracellulaires [43] et excrète des polysaccharides dans le milieu de culture [41]. Deux voies métaboliques : la glycolyse et le cycle des pentose-phosphates, peuvent permettre l'oxydation aérobie du glucose

(*) Manuscrit reçu le 27 mars 1969.

(**) Adresse actuelle : O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar-Hann (Sénégal).

par les levures [2 a]. Nous avons recherché quelques enzymes caractéristiques de chacune de ces voies chez *L. starkeyi*. Puis, à l'aide de glucose spécifiquement marqué sur le carbone, nous avons déterminé la part qui revenait à chacune d'elles dans le métabolisme oxydatif aérobie des suspensions cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° ORGANISMES. — Nous avons utilisé les souches C 76 de *L. starkeyi* (M. Domergues, Centre de Pédologie Biologique, C. N. R. S., Nancy) et 59 RL de *Saccharomyces cerevisiae* (M. Slonimski, Centre de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette). Ces deux organismes sont conservés sur des géloses nutritives inclinées contenant du glucose et de l'extrait de levure.

2° CULTURES. — Elles sont faites sur un milieu liquide ayant la composition suivante : KH_2PO_4 , 7 g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g ; NaCl, 0,1 g ; NH_4Cl , 2,5 g ; glucose, 8 g ; eau distillée, 900 ml ; eau des conduites, 100 ml. Dans le cas de *S. cerevisiae*, on ajoute en plus 2 g/l d'extrait de levure Difco. Les fioles à toxine contenant 0,5 l de milieu sont mises à agiter pendant 60 h à 32°. On récolte les cellules par centrifugation, puis on les lave à deux reprises.

3° EXTRAITS ENZYMATIQUES. — On fait une suspension dense des cellules dans du tampon phosphates ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$; pH = 6 ; M/15) que l'on traite à la presse de French. L'extrait est séparé des débris cellulaires par centrifugation à froid (16 000 t/mm ; 20 mn).

4° ACTIVITÉS ENZYMATIQUES. — Elles sont mesurées par spectrophotométrie (appareil Zeiss ; $\lambda = 340 \text{ m}\mu$) à la température ambiante. Nous donnons les références des méthodes employées pour chaque enzyme. *Glucose-6-phosphate-déshydrogénase* : Kornberg et Horecker [8]. *6-phosphogluconate-déshydrogénase* : Horecker et Smyrnotis [6]. *Fructose-diphosphate-aldolase* : Rutter et coll. [10].

Phosphofructokinase : Sols et Salas [12]. Nous avons ajouté du fluorure de sodium 20 mM à l'extrait pour empêcher l'inhibition de l'enzyme par l'ATP [4].

Hexokinase : On mesure la vitesse de réduction du NADP en présence d'un excès de glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Composition des systèmes : tampon tris pH = 8 0,1 M, 1,6 ml ; MgCl_2 0,1 M, 0,75 ml ; extrait enzymatique, 0,1 ml ; glucose-6-phosphate-déshydrogénase pure de levure, 0,1 ml ; NADP 0,01 M, 0,1 ml ; ATP 0,3 M, 0,1 ml ; β -mercapto-éthanol 0,15 M, 0,1 ml ; glucose 1 M, 0,15 ml.

Transcétolase : De La Haba et Racker [4]. Nous utilisons le ribose-5-phosphate comme substrat à la place d'un mélange de ribulose-5-phosphate et de ribose-5-phosphate. Nous dosons donc globalement la transcétolase et les pentose-phosphate-isomérases qui interviennent dans la conversion du ribose-5-phosphate en xylulose-5-phosphate.

Toutes les activités spécifiques sont exprimées en μ moles du substrat par minute et par milligramme d'azote.

Abréviations : ADP, adénosine-diphosphate ; ATP, adénosine-triphosphate ; NAD, nicotinamide-adénine-dinucléotide ; NADP, nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate ; TPP, thiamine-pyrophosphate.

5° TECHNIQUES ANALYTIQUES. — La teneur des extraits en azote est évaluée par micro-Kjeldahl. Le glucose [9] et le pyruvate [44] sont dosés par colorimétrie. L'acide pyruvique est extrait sous forme de sa 2,4-dinitrophénylhydrazone suivant la technique de White et Wang [15]. Le résidu obtenu à partir de l'échantillon initial (18 ml) est dissous dans 5 ml de NaOH 0,01 N. Pour contrôler la pureté du produit isolé, on compare son spectre en milieu alcalin à celui de la 2,4-dinitrophénylhydrazone préparée à partir de l'acide pyruvique pur.

Les mesures de radio-activité sont faites avec un compteur à scintillation. On mélange l'échantillon et le liquide de Bray. Une courbe de *quenching* préalablement établie permet d'effectuer les corrections nécessaires. Les radio-activités spécifiques sont exprimées en désintégrations par minute et par μmole . Nous utilisons la technique de Dawes et Holms [3] pour mesurer la radio-activité spécifique de l'acide pyruvique. Nous avons calculé le rapport : radio-activité spécifique de l'acide pyruvique/radio-activité spécifique du glucose initial. Katz et Wood [7] appellent ce rapport radio-activité spécifique molaire relative comparée au glucose. Pour estimer la participation des différentes voies d'utilisation du glucose, on s'est servi d'une méthode de calcul qui tient compte de la possibilité d'une synthèse de polysaccharides : exemple 3 figurant dans l'article de Katz et Wood [7].

RÉSULTATS

I. — EXPÉRIENCES FAITES AVEC DES EXTRAITS

1° DOSAGE DES DIFFÉRENTS ENZYMES.

Il nous a semblé intéressant de comparer les activités spécifiques des extraits de *S. cerevisiae*, levure dont le métabolisme est bien connu, à celles des extraits de *L. starkeyi*. On voit sur le tableau I que : 1° les niveaux de

TABLEAU I. — Activités enzymatiques spécifiques des extraits.

ENZYMES	ACTIVITÉS ENZYMATIQUES		RAPPORT
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. starkeyi</i>	
Hexokinase	5,6	0,715	7,85
Phosphofructokinase	0,06	0,004	15
Fructose-diphosphate-aldolase	0,165	0,07	2,36
Glucose-6-phosphate-déshydrogénase ...	0,49	1,8	0,27
6-phosphogluconate-déshydrogénase ...	0,111	0,52	0,213
Transcétolase	0,328	0,276	1,19

Chaque valeur représente la moyenne d'au moins deux déterminations faites sur des extraits provenant de cultures différentes. Dans la dernière colonne figure le rapport de l'activité spécifique de l'extrait de *S. cerevisiae* à l'activité spécifique de l'extrait de *L. starkeyi*.

trois des enzymes intervenant dans la première partie de la chaîne glycolytique : l'hexokinase, la phosphofructokinase et la fructose-diphosphate-aldolase, sont plus élevés chez *S. cerevisiae* que chez *L. starkeyi*; la diffé-

rence est particulièrement marquée dans le cas de la phosphofructokinase ; 2° on observe la situation inverse en ce qui concerne les deux déshydrogénases du cycle des pentose-phosphates, puisque la teneur en ces enzymes est approximativement cinq fois plus faible chez *S. cerevisiae* que chez *L. starkeyi* ; 3° le niveau de la transcétolase est le même chez les deux levures. Ces résultats suggèrent que, contrairement à ce qui se passe chez *S. cerevisiae*, le cycle des pentose-phosphates joue un rôle plus important que la glycolyse chez *L. starkeyi*.

2° FORMATION DE PYRUVATE A PARTIR DE DIFFÉRENTS ESTERS PHOSPHORIQUES EN PRÉSENCE D'ARSÉNITE.

Pour mettre en évidence la production de pyruvate, on opère en présence de l'arsénite qui inhibe la décarboxylation oxydative de cet acide organique (tableau II). Le fait que le 3-phosphoglycérate, le fructose-1,6-diphosphate

TABLEAU II. — Formation de pyruvate à partir d'esters phosphoriques par des extraits placés en présence d'arsénite.

SUBSTRAT	COFACTEURS	QUANTITÉ DE PYRUVATE (μmoles)		% DE CONVERSION	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. starkeyi</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. starkeyi</i>
3-phosphoglycérate	ADP + NAD	8,3	14,7	41,5	73
Fructose-1,6-diphosphate.	ADP + NAD	12,21	6,8	33	17
Glucose-6-phosphate ..	ADP + NAD + ATP	5,65	1,1	14,2	2,7
Ribose-5-phosphate	ADP + NAD + TPP	4,3	3,8	21	19

Chaque système contient : extrait, 1 ml ; ester phosphorique, 20 μmoles ; ADP, ATP, NAD ou TPP, 20 μmoles ; MgSO₄, 50 μmoles ; arsénite de sodium, 20 μmoles ; tampon phosphates M/15 pH = 6, quantité nécessaire pour compléter le volume à 5 ml. Chaque valeur représente la moyenne d'au moins deux déterminations faites sur des extraits provenant de cultures différentes. On laisse en incubation pendant 2 h à 37°, puis on ajoute 4 volumes d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et l'on dose l'acide pyruvique dans le surnageant obtenu après centrifugation. Les extraits utilisés contenaient de 1 à 2 mg d'azote/ml. Pourcentage de conversion : proportion de l'ester phosphorique transformé en acide pyruvique.

phate et le glucose-6-phosphate puissent donner du pyruvate indique que toutes les réactions de la chaîne glycolytique se produisent dans les extraits des deux levures. Quant à la conversion du ribose-5-phosphate en pyruvate, elle confirme la présence des isomérases des pentose-phosphates, de la transcétolase et des enzymes glycolytiques situés après la 3-phosphoglyceraldéhyde. On constate que le pourcentage de conversion du glucose-6-phosphate est nettement plus faible chez *L. starkeyi* que chez *S. cerevisiae*, résultat que laissent présager les dosages d'enzymes.

II. — EXPÉRIENCES FAITES AVEC DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

1° PRODUCTION DE PYRUVATE A PARTIR DU GLUCOSE EN PRÉSENCE D'ARSÉNITE PAR *L. starkeyi*.

Nous avons recherché si la respiration de l'oxygène en présence de glucose était sensible à l'arsénite. On emploie la technique manométrique de Warburg. Chaque système contient : glucose, 100 μ moles (diverticule); cellules, 9 à 10 mg (poids sec); tampon phosphates pH = 6 M/15, quantité nécessaire pour compléter le volume à 3 ml; KOH à 20 p. 100, 0,1 ml (puits central); phase gazeuse, air. La température est 32° C. L'arsénite de sodium est placé

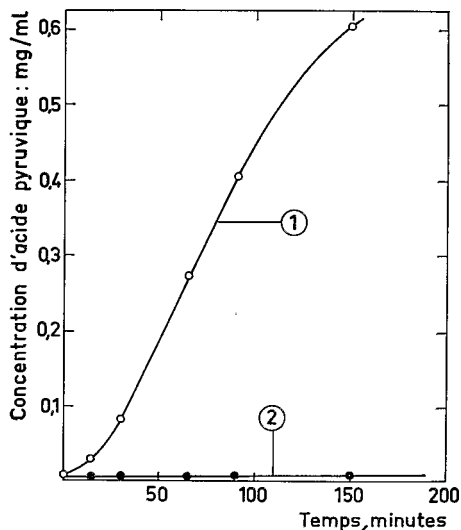


FIG. 1. — Production de pyruvate à partir de glucose par une suspension cellulaire de *L. starkeyi*. (1) : en présence d'arsénite de sodium 5 mM. (2) : en l'absence d'arsénite.

dans la coupe avec les cellules. Nous avons étudié aussi l'action de l'inhibiteur sur la respiration endogène. Pour ceci, on se sert de systèmes ne contenant pas de glucose. Nous constatons d'une part que la respiration endogène est insensible à l'arsénite 4 mM, d'autre part que la respiration mesurée en présence de glucose est inhibée respectivement de 46 et 64 p. 100 par des concentrations 2 et 4 mM.

On fait deux essais en erlenmeyers, l'un avec et l'autre sans arsénite, la composition du système étant la suivante : glucose 4 mM; cellules, 4,2 mg (poids sec)/ml; \pm arsénite de sodium 5 mM; tampon phosphates pH = 6 25 mM. La température est toujours de 32°. Les récipients sont aérés par agitation. Le glucose est ajouté au temps zéro. On prélève des échantillons de 3 ml auxquels on ajoute 4 volumes d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Les cellules sont éliminées par centrifugation, puis l'acide pyruvique est dosé

dans le surnageant. Ce n'est qu'en présence d'arsénite qu'il s'accumule des quantités élevées de pyruvate (fig. 1).

2° EMPLOI DU GLUCOSE RADIO-ACTIF SPÉCIFIQUEMENT MARQUÉ.

Nous avons utilisé du glucose $1-^{14}\text{C}$, $2-^{14}\text{C}$, $6-^{14}\text{C}$ et uniformément marqué : $\text{U-}^{14}\text{C}$. On indique sur le tableau III les quantités de glucose consommé et de pyruvate formé dans nos conditions expérimentales. Le tableau IV pré-

TABLEAU III. — Production de pyruvate en présence d'arsénite à partir de glucose marqué par une suspension cellulaire de *L. starkeyi*.

CONCENTRATIONS MILLIMOLAIRES	POSITION DE MARQUAGE DU GLUCOSE			
	$\text{U-}^{14}\text{C}$	$1-^{14}\text{C}$	$2-^{14}\text{C}$	$6-^{14}\text{C}$
Glucose : début de l'expérience	4,35	4,35	4,35	4,35
Glucose : fin de l'expérience	0,025	0,016	0,02	0,018
Pyruvate : fin de l'expérience	3,75	3,9	3,6	3,65

Chaque système contient : cellules, 250 mg (poids sec); glucose, 72 μmoles ; arsénite de sodium, 100 μmoles ; tampon phosphates M/15 pH = 6, quantité nécessaire pour compléter le volume à 18 ml. L'aération est réalisée par agitation. On laisse en incubation pendant 1 h à 32°.

TABLEAU IV. — Radio-activités spécifiques du glucose et de la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique.

TYPE DE MARQUAGE DU GLUCOSE	RADIO-ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES		RADIO-ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE MOLAIRE RELATIVE COMPARÉE DU PYRUVATE		% DU GLUCOSE MÉTABOLISÉ PAR LA VOIE DES PENTOSE- PHOSPHATES
	Glucose	Pyruvate (1)	Observée	Corrigée (2)	
$\text{U-}^{14}\text{C}$	11 222	5 000	0,445	0,500	
$1-^{14}\text{C}$	13 257	2 940	0,222	0,249	58
$2-^{14}\text{C}$	11 599	4 270	0,368	0,413	66
$6-^{14}\text{C}$	15 679	8 850	0,565	0,635	69

(1) Corrigée pour le gain ou la perte de marquage du carbone du groupement carboxyle du pyruvate.
(2) Corrigée pour la dilution due au métabolisme endogène.

sente les radio-activités spécifiques du glucose et du pyruvate mesurées au cours de l'une de nos trois expériences. On y trouve le pourcentage de participation du cycle des pentose-phosphates par rapport à la glycolyse calculé par la méthode graphique de Dawes et Holmes [3]. Les valeurs ainsi obtenues donnent une idée de l'importance relative de ces deux voies, mais elles ne

permettraient pas d'établir un bilan complet de l'utilisation du glucose métabolisé dans le cas où il se produirait une synthèse de polysaccharides. Pour pallier cette insuffisance nous avons utilisé le procédé de calcul plus général de Katz et Wood [7]. On trouve alors que 25 et 35,6 p. 100 du glucose est converti en pyruvate respectivement par la voie des pentose-phosphates et la glycolyse ; le reste, soit 39,4 p. 100, passe par une voie ne fournissant pas de glycéraldéhyde-3-phosphate. Sur le tableau V se trouvent représentés les

TABLEAU V. — Pourcentages d'activité des différentes voies du métabolisme du glucose chez *L. starkeyi*.

EXPÉRIENCE	POURCENTAGES D'ACTIVITÉ		
	VOIE DES PENTOSE- PHOSPHATES	GLYCOLYSE	VOIE NE FOURNISSANT PAS DE GLYCÉRAL- DÉHYDE-3- PHOSPHATE
N° 1	48,5	25,5	26
N° 2	50	23	27
N° 3	60	19	21
Moyenne	52,8	22,5	24,7

résultats exprimés cette fois-ci en pourcentage d'activité des différentes voies. Les valeurs ci-dessus correspondent à l'expérience 2. On voit d'autre part que les valeurs obtenues diffèrent peu d'une expérience à l'autre.

Nous avons fait une expérience semblable aux précédentes, avec une suspension de *S. cerevisiae*. Les radio-activités spécifiques du pyruvate comparées au glucose avaient les valeurs suivantes : U-¹⁴C, 0,5 ; 1-¹⁴C, 0,495 ; 2-¹⁴C, 0,5 ; 6-¹⁴C, 0,51. Ceci indique que le pourcentage d'activité du cycle des pentose-phosphates est compris entre 2 et 10 p. 100. La glycolyse représente donc ici de très loin la voie prédominante.

DISCUSSION

Les expériences effectuées avec le glucose spécifiquement marqué établissent le pourcentage de participation de chacune des différentes voies métaboliques dans le cas de suspensions cellulaires. Elles confirment les résultats fournis par les dosages d'enzymes et montrent que le cycle des pentose-phosphates semble jouer un rôle plus important que la glycolyse chez *L. starkeyi*. L'intervention d'une voie ne mettant pas en jeu les triose-phosphates s'explique vraisemblablement par la production de polysaccharides extracellulaires [11]. On pense que la production par le shunt des hexose-monophosphates de quantités élevées de NADP réduit favorise la synthèse des lipides par les levures [2 b]. L'activité élevée de cette voie chez *L. starkeyi* est, par conséquent, peut-être liée à son aptitude à accumuler des lipides.

Chez une autre levure aérobie stricte capable de produire des quantités importantes de lipides : *Rhodotorula gracilis*, 60 à 80 p. 100 du glucose assimilé passe par le cycle des pentose-phosphates [5]. Ce dernier organisme fournit d'autre part des extraits pratiquement dépourvus d'activité phosphofructokinase [4]. Ces observations doivent être rapprochées des nôtres, et l'on peut se demander si la voie des pentose-phosphates prédomine sur la glycolyse chez toutes les levures aérobies strictes.

RÉSUMÉ

1° RECHERCHE ET DOSAGE DES ENZYMES.

L'hexokinase, la phosphofructokinase, la fructose-diphosphate-aldolase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la 6-phosphogluconate-déshydrogénase et la transcétolase sont présentes dans les extraits de cultures aérobies de *L. starkeyi* contenant du glucose comme aliment carboné. Mais le niveau des deux premiers enzymes est relativement bas.

En présence d'arsénite 4 mM, les extraits catalysent la production de pyruvate à partir de 3-phosphoglycérate, de fructose-1,6-diphosphate, de glucose-6-phosphate ou de ribose-5-phosphate.

2° EXPÉRIENCES FAITES AVEC DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

L'arsénite 4 mM inhibe de 64 p. 100 la respiration de l'oxygène en présence de glucose, mais n'affecte pas la respiration endogène. Il s'accumule des quantités élevées de pyruvate lorsque les cellules sont mises en incubation aérobie avec du glucose en présence d'arsénite 5 mM.

Pour estimer la participation des différentes voies, nous avons employé du glucose spécifiquement marqué aux carbones 1, 2 et 6. On mesure la radio-activité du pyruvate produit après extraction sous forme de sa 2,4-dinitrophénylhydrazone. Les pourcentages moyens d'activité suivants ont été observés : voie des pentose-phosphates, 52,8 p. 100 ; glycolyse, 22,5 p. 100 ; voie ne fournissant pas de glycéraldéhyde-3-phosphate, 24,7 p. 100. Ces résultats indiquent que le cycle des pentose-phosphates joue un rôle important dans la dégradation aérobie du glucose par *L. starkeyi*.

* *

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à MM. Dommergues et Pichinoty pour les conseils qu'ils m'ont prodigués. Ce travail a bénéficié de l'aide financière du Centre National de la Recherche Scientifique et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Comité de Biologie Moléculaire).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRADY (R. J.) and CHAMBLISS (G. H.). The lack of phosphofructokinase activity in several species of *Rhodotorula*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 29, 343-348.
- [2] CHELDELIN (V. H.), WANG (C. H.) and KING (T. E.). Saccharides : alternate routes of metabolism. — V. Comparative studies. a) Examination of methodology, 443-465 ; b) Possible role of the pentose cycle in metabolism, 465-466. In *Comparative biochemistry*, Academic Press, New York, 1962, 3.
- [3] DAWES (E. A.) and HOLMS (W. H.). Metabolism of *Sarcina lutea*. — II. Isotopic evaluation of the routes of glucose utilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 29, 82-91.
- [4] DE LA HABA (G.) and RACKER (E.). Crystalline transketolase from baker's yeast. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1955, 1, 375-380.

- [5] HÖFER (M.). Estimation of pathways of glucose metabolism in *Rhodotorula gracilis*. *Folia Microbiol.*, 1968, **13**, 373-378.
- [6] HORECKER (B. L.) and SMYRNIOTIS (P. Z.). 6-phosphogluconic dehydrogenase. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1955, **4**, 323-327.
- [7] KATZ (J.) and WOOD (H. G.). The use of glucose-C¹⁴ for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. *J. biol. Chem.*, 1960, **235**, 2165-2177.
- [8] KORNBERG (A.) and HORECKER (B. L.). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1955, **4**, 323-327.
- [9] PARK (J. T.) and JOHNSON (M. J.). Ferricyanide method of Park and Johnson. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1957, **3**, 86-87.
- [10] RUTTER (W. J.), HUNSLEY (J. R.), GROVES (W. E.), CALDER (J.), RAJKUMAR (T. V.) and WOODFIN (B. M.). Fructose diphosphate aldolase. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1966, **9**, 479-498.
- [11] SŁODKI (M. E.) and WICKERHAM (L. J.). Extracellular polysaccharides and classification of the genus *Lipomyces*. *J. gen. Microbiol.*, 1966, **42**, 381-385.
- [12] SOLS (A.) and SALAS (M. L.). Phosphofructokinase. — III. Yeast. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1966, **9**, 436-442.
- [13] STARKEY (R. L.). Lipid production by a soil yeast. *J. Bact.*, 1946, **51**, 33-50.
- [14] UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) and STAUFFER (J. F.). *Manometric techniques*, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1957, 202-203.
- [15] WHITE (G. A.) and WANG (C. H.). The dissimilation of glucose and gluconate by *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.*, 1964, **90**, 408-423.
-

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette à Paris (France).
Printed in France. (71438)

