

В. ФИЛИППОВ и М. ИЛЬИНА

СОСТОЯНИЕ БИОТИНА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 II 1954)

Биотин или витамин Н относится к физиологически активным веществам сильного действия. Знания биохимии биотина крайне ограничены, хотя это соединение широко распространено в мире растений и животных. Наши исследования направлены на выяснение состояния биотина в растении и распределения его по различным органам.

В растительной клетке биотин находится в свободном и связанном состоянии. Свободный биотин извлекается водой; связанный биотин прочно присоединен к белку и отделяется от него под воздействием кислот, щелочей и ферментов (¹). В более поздних работах (⁵⁻⁸) подтверждается факт связывания биотина белком, но указывается, что у растений соединяется с белком лишь незначительная часть биотина. В животных тканях основная часть биотина связана с белком и связь является более прочной.

Для определения биотина мы применяли дрожжевой метод (^{3, 9, 10}). Биотин извлекался из исследуемого материала автоклавированием с 1 *N* серной кислотой при 115° в течение 3 час. (⁴). Через каждый час автоклавирование прерывалось, вытяжка отфильтровывалась и заменялась новой порцией серной кислоты (10—12 мл кислоты на 1 г воздушно-сухого материала). Три порции вытяжки объединялись, объем их доводился до 50 мл. Вытяжку можно хранить на холоду несколько недель и использовать по частям. Серная кислота удалялась из вытяжки едким бариером непосредственно перед каждым определением биотина. Вытяжка из исследуемого материала вносится по 1 мл в пробирки. Одновременно в ряд пробирок вносится по 1 мл раствора, содержащего 0,5; 0,40; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05; 0,00 м μ биотина. Пробирки стерилизуются в автоклаве при 105° в течение 20 мин.

Состав питательной среды для дрожжей: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 г; $(NH_4)_2SO_4$ 3,0 г; KH_2PO_4 2,5 г; аспарагин 1,0 г; сахароза 20 г; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 мг; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,1 мг; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,85 мг; тиамин 4 мг; инозит 10 мг; пантотенат кальция 0,5 мг; пиродоксин 1,0 мг; воды дистиллированной до 850 мл. Среда, помещенная в колбу, стерилизуется описанным выше способом. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 77 (культура на сусл-агаре) вносятся в среду в количестве 2—10 мг сухого вещества на 1 л среды. После встряхивания дрожжевая суспензия вносится в пробирки с исследуемым материалом и биотином по 5 мл в каждую. Повторность 5-кратная. Инкубация 16—24 часа. Рост дрожжей определяется фотоэлектрическим колориметром. Из показаний роста дрожжей в пробирках с биотином строится кривая, по которой определяется содержание биотина в опытных пробирках. Максимальный рост дрожжей наблюдается обычно при внесении 3—4 м μ биотина в пробирку, полумаксимальный рост — при внесении 0,1—0,2 м μ биотина. Содержание биотина в опытных пробирках должно быть близким к полумаксимуму.

Цитрат натрия 1 г/л в качестве буфера ускоряет максимальный рост на 10—12%, а полумаксимальный на 2—3%, что позволяет отказаться от применения буфера. Усиление аэрации питательной среды путем встряхивания пробирок ускоряло рост на 30—35% в пределах полумаксима и максимума. В течение инкубации достаточно 4—5 встряхиваний по 5—10 сек.

Таблица 1

Определение биотина в полной питательной среде и при недостатке витаминов

Тест-организм	Обнаружено биотина в мμ		% обнаружения синтетического биотина
	картофельный сок	картофельный сок + 0,1 мμ биотина	
При нормальном содержании витаминов			
<i>S. cerevisiae</i> 77	0,088	0,190	102
<i>S. ellipsoideus</i> 465 . . .	0,082	0,185	103
При содержании витаминов 20% от нормального			
<i>S. cerevisiae</i> 77	0,043	0,170	127
<i>S. ellipsoideus</i> 465 . . .	0,100	0,180	80

Важное значение имеет витаминная часть питательной среды, так как дрожжи нуждаются в комплексе физиологически активных веществ. Из табл. 1 видно, что точность определения биотина зависит от дозировок витаминов в питательной среде: при полной питательной среде при включении всех необходимых витаминов в надлежащей концентрации данные определения биотина лежат в допустимых при аналитической работе границах точности; снижение концентрации витаминов в питательной среде увеличивает ошибку определения. Различия в росте индикаторных организмов — *Saccharomyces cerevisiae* 77 и *S. ellipsoideus* 465 при полной питательной среде сглаживаются.

Таблица 2

Свободный и связанный биотин в проростках

Материал	Содержание биотина в вытяжке в мμ/мл			
	водная вытяжка	кислотные вытяжки		
		1N H ₂ SO ₄	2N H ₂ SO ₄	5N H ₂ SO ₄
Проростки пшеницы	58	250	255	170
Проростки кукурузы	78	118	118	117

Данные о низком содержании связанного биотина (7) в свежих вегетативных органах растений мы объясняем несовершенством применявшейся методики. Лампен (7) обнаруживал в кислотных вытяжках из свеклы, капусты, моркови, томатов, малины меньше биотина, чем в водных вытяжках. Извлечение биотина кислотой, повидимому, сопровождалось в данном случае его разрушением. Значительное содержание биотина в водной вытяжке объясняется тем, что извлечение водой проводилось под давлением, а это приводило к отщеплению от белка части связанного биотина.

Ниже мы приводим результаты опытов по установлению прочности связи биотина с клеточными белками в 10-дневных проростках пшеницы и

mann, J. Biol. Chem., 187, 23 (1950). ⁵ L. Cora, G. Rindi, C. Casella, Abstracts commun. 1st Intern. Congr. Biochem., 1949, p. 34-32. ⁶ M. Ives, A. Pollard, C. Elvehjem, F. Strong, J. Nutrition, 31, 347 (1946). ⁷ J. Lampen, G. Bahler, W. Peterson, *ibid.*, 23, 41 (1942). ⁸ G. Shull, B. Hutchings, W. Peterson, J. Biol. Chem., 142, 913 (1942). ⁹ E. Snell, R. Eakin, J. Williams, J. Am. Chem. Soc., 32, 175 (1940). ¹⁰ J. White, D. Munns, J. Inst. Brewing, 56, 141 (1950).