

48. Mario PRINCIVALLE. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. - III. Un nuovo metodo per la titolazione della biotina.

Riassunto. — Il metodo descritto si basa sull'utilizzazione di un mutante di *Penicillium chrysogenum* che richiede solo e specificamente la biotina come fattore di crescita. La titolazione si fa in terreno solido su piastra col metodo delle capsule di porcellana. Il diametro degli aloni di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 0,005 e 5 mcg/cm³.

Résumé. — La méthode décrite est basée sur l'utilisation d'un mutant de *Penicillium chrysogenum* qui demande seulement et spécifiquement la biotine comme facteur de croissance. Le titrage se fait, par la méthode des petites capsules de porcelaine, dans un milieu solide. Le diamètre des halos de croissance varie d'une façon linéaire avec le logarithme de la dose dans les mesures comprises entre 0,005 et 5 mcg/cm³.

Summary. — The method described is based on the use of a mutant of *Penicillium chrysogenum* having a single and specific growth requirement for biotin. The assay is carried out on plates of solid medium using the porcelain cup technique. The diameter of the halo of growth varies linearly with the logarithm of the dose in the range 0.005-5 µg/ml.

Zusammenfassung. — Die geschilderte Methode bedient sich eines Mutanten von *Penicillium chrysogenum* der ausschliesslich und spezifisch Biotin als Wachstumsfaktor benötigt. Die Titrierung erfolgt auf festem Nährboden mit Porzellankapseln. Der Durchmesser der Wachstumsringe wächst linear mit dem Logarithmus der Dose für Konzentrationen von 0,005 bis 5 cmg/cm³ von Biotin.

La biotina è presente nei materiali biologici e negli alimenti in concentrazioni così basse che la sua determinazione può essere eseguita solo in base all'effetto che questa vitamina esercita sugli animali superiori o su quei microrganismi incapaci di sintetizzarla. Non esistono metodi chimici né fisici atti a titolare la biotina. I metodi microbiologici sono

quelli usati più comunemente per i vantaggi di semplicità, economia, precisione e rapidità che ovviamente offrono.

Per il dosaggio microbiologico della biotina si conoscono vari metodi che utilizzano i microrganismi più disparati. Le prime esperienze di titolazione furono condotte da SNELL, EAKIN e WILLIAMS ⁽¹⁾ su *Saccharomyces cerevisiae*. Successivamente WEST e WOGLOM ⁽²⁾ utilizzarono *Rhizobium trifolii*, LAMPEN, BAHLER e PETERSON ⁽³⁾ *Clostridium butylicum*, HODSON ⁽⁴⁾ *Neurospora crassa*.

Si conoscono infine alcuni metodi basati sull'uso di lattobacilli: il *Lactobacillus casei* fu sperimentato da LANDY e DICKEN ⁽⁵⁾ e da SHULL e PETERSON ⁽⁶⁾; il *Lactobacillus arabinosus* fu utilizzato da WRIGHT e SKEGGS ⁽⁷⁾ e da LUCKEY, MOORE ed ELVEHJEM ⁽⁸⁾.

Il metodo più seguito è quello di WRIGHT e SKEGGS, in cui il microrganismo titolatore è *L. arabinosus* 17-5, A.T.C.C. 8014: questo metodo risponde a molti requisiti in quanto è molto sensibile (risponde a 0,03 milimicrogrammi di biotina) e discretamente specifico; tuttavia, come tutti i metodi che impiegano i lattobacilli, richiede un terreno di coltura assai complesso e di laboriosa preparazione.

Il metodo di titolazione che noi proponiamo per la biotina utilizza un ceppo di *Penicillium chrysogenum* che esige solo e specificamente la biotina come fattore di crescita. La prova si fa in terreno solido, su piastra, col metodo delle capsule di porcellana.

MATERIALI E MODALITÀ TECNICHE

1. *Microrganismo titolatore*. - Il mutante di *Penicillium chrysogenum* utilizzato nel presente metodo fu isolato dal dott. G. SERMONTI di questo Istituto mediante irradiazione ultravioletta (*P. chrysogenum* Istisan 177).

2. *Mantenimento del ceppo*. - Il terreno più conveniente è quello di Moyer, così composto:

K ₂ HPO ₄	g	1
MgSO ₄	g	0,5
KCl	g	0,5
FeSO ₄	g	0,01
Saccarosio	g	30
Corn step liquor	g	10
Agar	g	18
Acqua distillata	cm ³	1000
pH finale = 7		

Il ceppo va trapiantato ogni due settimane. Una buona sporificazione si ottiene coltivando il micete su chicchi d'orzo umettati con una soluzione sporulante (acqua cm^3 1000, asparagina g 1, glicerina g 30) e sterilizzati in autoclave in matracci da 250 cm^3 (10-15 g di orzo per matraccio). La temperatura di incubazione è 26°C .

3. *Preparazione della semina.* - La sospensione di spore da usarsi per la semina può esser preparata in maniera soddisfacente da una coltura ben sporificata del micete su chicchi di orzo: alla coltura si aggiungono $50\text{-}100 \text{ cm}^3$ di soluzione fisiologica sterile, si agita energicamente per qualche minuto, quindi si filtra il liquido attraverso alcuni strati di garza sterile. La sospensione così ottenuta si può conservare per diverse settimane in frigorifero a $+ 4^\circ\text{C}$.

Al momento della prova si preleva un certo volume della sospensione, si lavano le spore per centrifugazione e si diluiscono fino ad ottenere una leggera torbidità (circa 10^6 spore per cm^3).

4. *Terreno di prova.* - Si è dimostrato adatto il terreno di Czapek-Dox cui si aggiunge, prima della sterilizzazione, agar purificato (ad es. Bacto-Agar Difco) e lavato, nella proporzione dell'1,8%. La composizione è la seguente:

NaNO_3	g	3
KCl	g	0,5
$\text{MgSO}_4 (7 \text{ H}_2 \text{ O})$	g	0,5
$\text{FeSO}_4 (7 \text{ H}_2 \text{ O})$	g	0,01
KH_2PO_4	g	1
Glucosio	g	40
Agar (Difco)	g	18
Acqua distillata	cm^3	1000
pH finale = 7		

5. *Allestimento della prova.* - Nelle nostre prove abbiamo usato piastre rettangolari di vetro Pyrex, di $\text{cm } 22 \times 33$ che ospitavano 24 capsuline di porcellana a distanza di 50 mm l'una dall'altra. Le piastre avevano il fondo perfettamente piano, e, con l'aiuto di una livella venivano disposte perfettamente orizzontali.

Sciogliere l'agar, lasciarlo raffreddare a 48°C , aggiungere la sospensione di spore (1 cm^3 per ogni 20 cm^3 di terreno) e versarlo nelle piastre in modo da avere uno strato uniforme di 4-5 mm di spessore. Lasciar solidificare l'agar, quindi disporre sulla sua superficie, a distanza di 50 mm l'una dall'altra, le capsuline contenenti le soluzioni di biotina. Portare in termostato a 26°C . Le letture si eseguono dopo 48-72 ore.

RISULTATI

1. *Specificità della risposta alla biotina.* - Il ceppo da noi usato richiede la biotina in maniera specifica, infatti questa sostanza non può essere sostituita da nessuna delle vitamine del gruppo B né dagli aminoacidi. Per stabilire questo dato abbiamo saggiato il ceppo con diverse sostanze riportate nella tabella 1.

TABELLA I

Sostanze provate	Effetto sulla crescita
Piridossina (0,2 mg/cm ³)	—
Nicotinamide (0,2 mg/cm ³)	—
Riboflavina (0,2 mg/cm ³)	—
Tiamina (0,2 mg/cm ³)	—
Calcio pantotenato (0,2 mg/cm ³)	—
Acido folico (0,2 mg/cm ³)	—
Acido paraminobenzoico (0,2 mg/cm ³)	—
Vitamina B ₁₂ (50 mcg/cm ³)	—
Idrolizzato di caseina (20 mg/cm ³)	—
(Vitamin free casaminoacids, Difco)	
Idrolizzato di caseina + vitamine	—

In un'altra esperienza è stata saggiata una combinazione della miscela vitamine-idrolizzato di caseina con la biotina; quest'ultima in 2 concentrazioni (0,005 e 0,05 mcg/cm³). L'effetto della biotina sulla crescita non viene modificato dalla contemporanea presenza delle sostanze provate.

2. *Curva di taratura.* - La curva di taratura da noi costruita dimostra che nelle condizioni del nostro esperimento il diametro dell'alone di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 0,005 e 5 mcg/cm³ (V. fig. 1).

3. *Titolazione di un campione a concentrazione ignota.* - Le nostre prove sono state eseguite su un'unica piastra, usando il metodo cosiddetto « dei 4 punti », in cui vengono saggiate 2 concentrazioni dello standard e 2 concentrazioni del campione da titolare. Le varie concentrazioni vengono disposte sulla piastra seguendo la disposizione a « blocchi randomizzati ».

Il procedimento è analogo a quello da noi adottato per la titolazione della tiamina mediante *Penicillium chrysogenum* 152 (⁹), differendo solo nelle dimensioni della piastra e nella distanza fra le capsule. I punti o concentrazioni per lo standard sono 0,005 e 0,05 mcg per cm³.

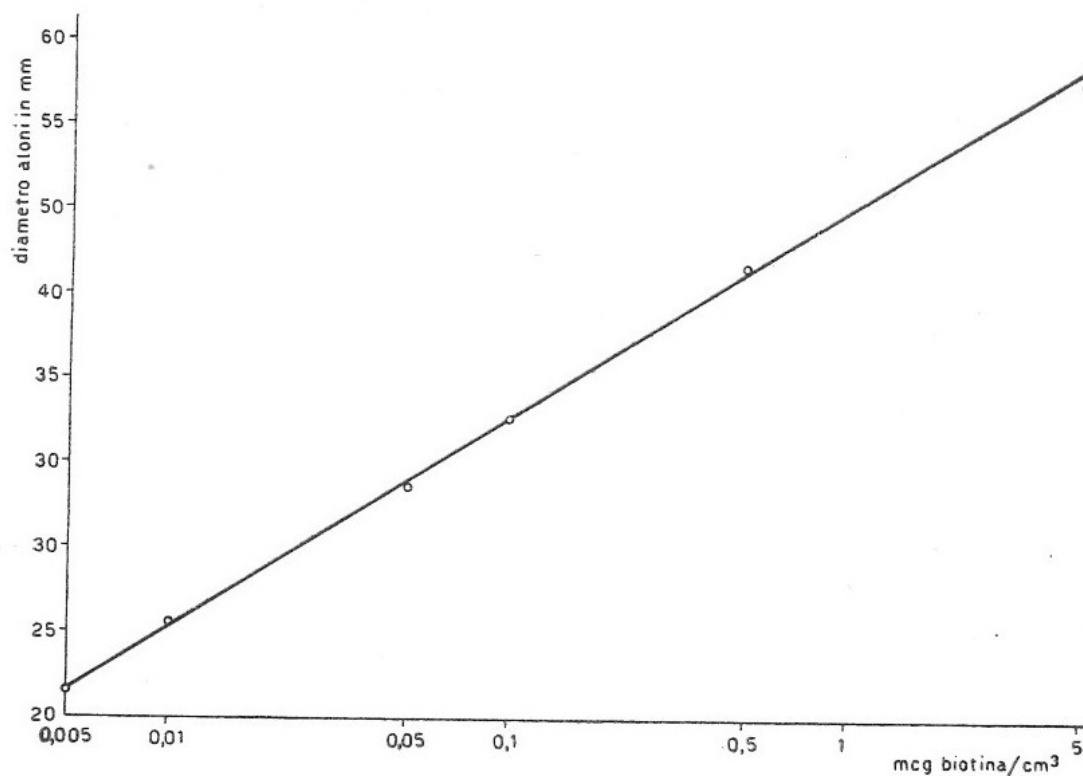


Fig. 1. - Risposta del mutante *P. crysogenum* 177 alla biotina.

Il calcolo del titolo di un campione ignoto e il calcolo dell'errore del titolo sono stati eseguiti mediante lo stesso procedimento già descritto nel succitato lavoro: l'errore è compreso nell'ambito di $\pm 10\%$.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il metodo descritto presenta, rispetto agli altri metodi microbiologici di titolazione della biotina, i seguenti vantaggi:

1) *Semplicità di allestimento delle prove*: disponendo della sospensione di spore (che peraltro può esser conservata in frigorifero per molte settimane) la titolazione viene effettuata in tempo relativamente breve. Non è necessario che le soluzioni dello standard e del campione siano sterili.

2) *Economia di materiali*: i terreni di coltura da noi usati per il mantenimento del ceppo e per la prova sono di facilissima preparazione e sono costituiti da ingredienti poco costosi e di comune uso. Nessuna speciale apparecchiatura è necessaria per le letture.

3) *Precisione*: a parità di repliche per ciascuna concentrazione dello standard e del campione, il nostro metodo fornisce risultati più

soddisfacenti; il parallelismo delle curve ottenute permette un controllo più diretto della attendibilità dei risultati.

4) *Resistenza agli antibiotici*: il ceppo Istisan 177 non è sensibile agli antibiotici attivi contro gli schizomiceti (penicillina, streptomina, cloramfenicolo, tetraciclina etc.). Il nostro metodo si dimostra quindi particolarmente utile per il dosaggio della biotina in presenza di antibiotici.

La sensibilità del metodo da noi proposto, pur essendo alquanto inferiore a quella degli altri metodi microbiologici (ad es. è di circa 50 volte inferiore alla sensibilità dimostrata dal succitato metodo di WRIGHT e SKEGGS), è tuttavia sufficiente per consentire la determinazione della biotina in materiali biologici, alimenti e prodotti farmaceutici.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SNELL E. E., EAKIN R. E., WILLIAMS R. J. - Univ. Texas Pub. No. 4437: 48 (1944).
 - (²) WEST P. M., WOGLOM W. H. - Cancer Res., 2: 324 (1942).
 - (³) LAMPEN J. O., BAHLER S. P., PETERSON W. H. - J. Nutrit., 23: 44 (1942).
 - (⁴) HODSON A. Z. - J. biol. Chem., 157, 383 (1945).
 - (⁵) LANDY M., DICKEN D. M. - J. Lab. clin. Med., 27: 4086 (1942).
 - (⁶) SHULL G. M., PETERSON W. H. - J. biol. Chem., 142: 943 (1943).
 - (⁷) WRIGHT L. D., SKEGGS H. R. - Proc. Soc. exp. biol. Med., 56: 95 (1944).
 - (⁸) LUCKEY T. D., MOORE P. R., HELVEHJEM C. A. - Proc. Soc. exp. biol. Med., 64: 97 (1946).
 - (⁹) PRINCIVALLE M. - Rend. Istituto Sup. Sanità.
-