

## 146. A. Bach und D. Michlin: Über die sogenannte Succino-Dehydrase.

[Aus d. Biochem. Institut d. Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.]

(Eingegangen am 25. Januar 1927.)

In früheren Mitteilungen<sup>1) 2)</sup> wurde bewiesen, daß das isolierte Schar-  
dinger-Enzym (Perhydridase, Aldehydrase, Xanthin-Oxydase), welches  
die Oxydo-Reduktion der Aldehyde, des Hypoxanthins und des Xanthins  
auf Kosten des Wasser-Moleküls bewirkt, nicht instande ist, den molekularen  
Sauerstoff auf die genannten Substrate zu übertragen, d. h. als direkte Oxydase  
zu fungieren. Andererseits ist es H. Wieland<sup>3)</sup> nicht gelungen, durch die  
Vermittlung der isolierten Phenol-Oxydase Phenole unter Ersatz des Sauer-  
stoffs durch andere Wasserstoff-Acceptoren (Methylenblau, Dinitro-benzol  
usw.) zu oxydieren. Die enzymatische Oxydo-Reduktion auf Kosten  
des Wasser-Moleküls und die enzymatische Oxydation auf Kosten  
des Sauerstoff-Moleküls sind daher zwei voneinander völlig unab-  
hängige, durch verschiedene Enzyme ausgelöste Prozesse. Mit  
dieser Schlußfolgerung stehen im Widerspruch in der Literatur vor-  
handene Angaben über die Existenz einer Succino-Dehydrase, welche  
die Dehydrierung der Bernsteinsäure sowohl durch die Vermittlung  
des Methylenblaus, wie durch die des molekularen Sauerstoffs hervorbringen  
soll. Gegenstand vorliegender Mitteilung ist die Aufklärung dieses Wider-  
spruchs.

T. Thunberg<sup>4)</sup> machte 1909 die Beobachtung, daß Bernsteinsäure die Absorption  
von Sauerstoff durch fein zerkleinertes Muskelgewebe steigert. Im Jahre 1910 unter-  
suchten F. Battelli und L. Stern<sup>5)</sup> diese Erscheinung näher und gelangten zur Ansicht,  
daß sich hierbei ein oxydierendes Enzym, das sie später als Succino-Oxydon be-  
zeichneten, betätige. 1918 wurde von Thunberg<sup>6)</sup> mitgeteilt, daß in Übereinstimmung  
mit der Wielandschen Dehydrierungs-Theorie die Oxydation der Bernsteinsäure auch  
dann erfolgt, wenn Methylenblau an Stelle von Sauerstoff als Wasserstoff-Acceptor  
angewandt wird. Auf die Oxydation der Bernsteinsäure wurde daraus geschlossen,  
daß ausgewaschenes Muskelgewebe, welches für sich allein Methylenblau äußerst langsam  
oder gar nicht reduziert, auf Zusatz von neutralisierter Bernsteinsäure den Farbstoff  
entfärbt. Bei der weiteren Bearbeitung des Gebietes gelangte Thunberg<sup>7)</sup> zwei Jahre  
später zu der Ansicht, „daß es ein auf die Bernsteinsäure speziell eingestelltes, dieselbe  
dehydrogenisierendes Enzym gibt, das bei Abwesenheit von Sauerstoff den Wasserstoff  
auf eventuell anwesendes Methylenblau überführt, es in seine Leukobase verwandelnd“.  
Thunbergs Angaben erregten gewisses Aufsehen, da sie als Beweis für die Richtigkeit  
der Wielandschen Dehydrierungs-Theorie betrachtet wurden.

<sup>1)</sup> A. Bach und K. Nikolajew, *Biochem. Ztschr.* **169**, 105 [1926].

<sup>2)</sup> A. Bach und D. Michlin, *B.* **60**, 82 [1927].    <sup>3)</sup> *B.* **59**, 1184 [1926].

<sup>4)</sup> *Skand. Arch. Physiol.* **22**, 406 [1909].    <sup>5)</sup> *Biochem. Ztschr.* **30**, 172 [1911].

<sup>6)</sup> *Skand. Arch. Physiol.* **35**, 163 [1918].    <sup>7)</sup> *Ebenda* **40**, 1 [1920].

Indessen läßt die nähere Beurteilung und eventuelle Nachprüfung der experimentalen Grundlage der Thunbergschen Auffassung erkennen, daß die Existenz einer Succino-Dehydrase im Sinne Wielands keineswegs als bewiesen angesehen werden kann.

I. Die Größenordnung der Umsätze: Würde die Dehydrierung der Bernsteinsäure beim Methylenblau- und Sauerstoff-Versuch durch ein und dasselbe Enzym bewirkt, so wäre zu erwarten, daß die Umsätze, wenn nicht genau äquivalent, doch etwa von derselben Größenordnung sein würden. Dem ist aber nicht so. Wir führten gleichzeitig Methylenblau- und Sauerstoff-Versuche mit ein- und demselben Material aus und fanden, daß in gleichen Zeit-Abschnitten etwa 300-mal so viel Sauerstoff absorbiert wird, wie den reduzierten Methylenblau-Mengen entspricht (Versuche 1–5).

II. Die Beeinflussung durch Blausäure: Batelli und Stern<sup>5)</sup> beobachteten, daß die Sauerstoff-Absorption durch Muskelgewebe in Anwesenheit von Bernsteinsäure durch Blausäure gehemmt wird. Thunberg<sup>6)</sup> bestätigte diese Beobachtung und fand seinerseits, daß dieses Gift auf die Entfärbung des Methylenblaus durch Muskelgewebe und Bernsteinsäure ohne Einfluß ist. Von der Annahme ausgehend, daß in beiden Fällen ein und dasselbe Enzym tätig ist, deutet er seinen Befund in der Weise, daß die Blausäure auf den Sauerstoff, nicht aber auf das Methylenblau, hemmend einwirkt. Bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse ist es kaum erforderlich hervorzuheben, daß es nicht der Sauerstoff, sondern der Katalysator (Oxydase oder Eisen-System nach Warburg) ist, der durch die Blausäure gehemmt wird.

III. Die Beeinflussung durch die H'-Konzentration: Die Reduktion von Farbstoffen, Nitraten usw. in tierischen Geweben kommt, wie dies zuerst von Bach<sup>8)</sup> festgestellt wurde, zustande durch das Zusammenwirken eines Enzyms, welches mit dem Schardingerschen identisch ist, und eines wasser-löslichen, kochbeständigen Coenzym. Letzteres, welches jetzt als „Atmungs-Material“ angesehen wird, existiert in den Geweben teils in gelöstem, teils in adsorbiertem Zustande. Frisch zerkleinertes Muskelgewebe reduziert Methylenblau ziemlich energisch. Wird das Material einige Male mit Wasser gewaschen, so verliert es die Fähigkeit, den Farbstoff zu reduzieren. Dies bedeutet aber noch nicht, daß das Coenzym völlig entfernt worden ist, sondern nur, daß dessen Verteilung zwischen dem Adsorbens und dem Medium sich zugunsten des ersteren gestaltet. Eine Veränderung des Mediums mag eine weitere Elution des Coenzym hervorbringen. Gerade dies geschieht, wenn das Muskelgewebe mit einer neutralisierten Lösung von Bernsteinsäure an Stelle des Wassers in Berührung kommt. Als wir vergleichende Methylenblau-Versuche an ein und demselben Material mit auf  $p_H = 7.6$  neutralisierten Bernsteinsäure-Lösungen einerseits und Phosphat-Gemischen von gleichem  $p_H$  andererseits anstellten, fanden wir, daß in beiden Versuchsreihen die Reduktion des Methylenblaus praktisch gleichzeitig erfolgte (Versuche 6–8). Kontrollversuche mit Wasser an Stelle der Bernsteinsäure- und Phosphat-Lösungen fielen negativ aus. Ein Borat-Gemisch von  $p_H = 7.8$  ergab die gleiche Reduktion, wie die erwähnten Zusätze (Ver-

<sup>5)</sup> Biochem. Ztschr. **31**, 443, **33**, 282 [1911], **38**, 154 [1912], **58**, 205 [1913].

such 9). Genügt schon die geringe Alkalität der zugesetzten Lösung für das Auftreten der Methylenblau-Reduktion, so liegt kein Grund vor, eine Dehydrierung der Bernsteinsäure anzunehmen, so lange nicht bewiesen ist, daß letztere dabei wirklich abgebaut wird. Wegen der außerordentlichen Geringfügigkeit des Umsatzes, die der Erforschung des Bernsteinsäure-Abbaus im Methylenblau-Versuch fast unüberwindliche Schwierigkeiten bereitet, ist bisher noch kein einziger Versuch in dieser Richtung bekannt geworden. Die in der Literatur angeführte Angabe, wonach Thunberg die Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure im Methylenblau-Versuch erzielt hätte<sup>9)</sup>, beruht auf einem Mißverständnis. Hervorzuheben ist noch, daß, während Phosphat-Gemische von  $p_H = 7.6$  die Reduktion des Methylenblaus durch ausgewaschenes Muskelgewebe, und zwar in demselben Maße wie Succinate, bewirken, sind sie auf die Absorption von Sauerstoff unter gleichen Bedingungen ohne jeden Einfluß (Versuch 10).

IV. Die Beeinflussung durch Neutralsalze: Bei der weiteren Bearbeitung des Gebietes fand Thunberg<sup>7)</sup>, daß einfacher Zusatz von Natriumchlorid oder Kaliumchlorid zu einem Gemisch von ausgewaschenem Muskelgewebe und Methylenblau die Reduktion des Farbstoffs hervorbringt. Diese Reduktion führt er mit Recht auf die dem ausgewaschenen Gewebe noch innewohnende, latente Fähigkeit zurück, für sich allein Methylenblau zu entfärben (Rest-Reduktion). Diese Erscheinung läßt sich am einfachsten durch die Annahme erklären, daß durch den Salzzusatz die Lösungsverhältnisse und die osmotischen Eigenschaften des Mediums derartig verändert werden, daß eine weitere Desorption des Coenzym zustande kommt. Auf eine ähnliche Erklärung war schon Thunberg selber gekommen, denn er schreibt: „Möglicherweise beruht die erstere (Rest-Reduktion) darauf, daß gewisse wirkliche Aktivatorer äußerst schwer aus der Muskelmasse auszuwaschen sind.“ Diesen Gedankengang verfolgte er aber nicht weiter und bemühte sich statt dessen, eine Methode „zur Eliminierung von seiten der Rest-Reduktion herrührenden Irrtümern“ auszuarbeiten. Diese Methode besteht darin, daß den Hauptproben und den Kontrollproben gleiche Mengen eines Gemisches von Dikaliumphosphat und Monokaliumphosphat im Verhältnis 3:1 zugesetzt werden. Bei der Nachprüfung der Methode stellte sich Folgendes heraus:

Das erwähnte Phosphat-Gemisch ergibt eine Lösung von  $p_H = 7.3$ . In Anwesenheit von ausgewaschenem Muskelgewebe entfärbt diese Lösung Methylenblau unter sonst gleichen Bedingungen mit derselben Geschwindigkeit wie die neutralisierte Bernsteinsäure-Lösung. Wird ein Teil der Phosphat-Lösung durch die entsprechende Menge Succinat-Lösung ersetzt, so zeigt das Gemisch dieselbe Reduktions-Geschwindigkeit wie jede der ursprünglichen Lösungen für sich allein (Versuch 11). Ganz ähnliche Resultate wurden erhalten mit Essigsäure und Citronensäure, die nach Thunberg ebenfalls durch Methylenblau dehydriert werden sollen (Versuch 12). Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, daß die angebliche Dehydrierung der organischen Säuren sich hier mit der Rest-Reduktion deckt. Erwähnt sei allerdings, daß, wie dies schon von Thunberg festgestellt worden ist, Salze der Oxalsäure, der Buttersäure und einiger anderer organischer Säuren

<sup>9)</sup> vergl. Oppenheimers Handb. d. Biochem., 5. Aufl., Bd. 2, 264 [1923].

auf die Rest-Reduktion einen äußerst geringen oder gar keinen Einfluß ausüben.

Neutralsalze bewirken keine Steigerung der Sauerstoff-Absorption durch ausgewaschenes Muskelgewebe (Versuch 13).

#### Zusammenfassung.

1. Unter dem Einfluß der Bernsteinsäure wird durch ausgewaschenes Muskelgewebe etwa 300-mal so viel Sauerstoff aufgenommen, wie dem reduzierten Methylenblau entspricht.

2. Blausäure ist auf die Methylenblau-Reduktion ohne Einfluß, während sie auf die Sauerstoff-Aufnahme hemmend einwirkt.

3. Anorganische Puffer-Lösungen (Phosphat- und Borat-Gemische) im Bereich von  $p_H = 7.4$  und neutrale Salzlösungen wirken auf die Methylenblau-Reduktion fördernd und lassen die Sauerstoff-Aufnahme unbeeinflusst.

4. Die durch anorganische Puffer-Lösungen hervorgebrachte Methylenblau-Reduktion („Rest-Reduktion“) ist von derselben Größenordnung wie die Reduktion, welche durch neutralisierte Bernsteinsäure-Lösung bewirkt wird.

Aus den Punkten 1—3 geht hervor, daß die Methylenblau-Reduktion und die Sauerstoff-Aufnahme zwei voneinander grundsätzlich verschiedene Prozesse sind. Punkt 4 läßt die angebliche Dehydrierung der Bernsteinsäure im Methylenblau-Versuch als sehr zweifelhaft erscheinen.

### Beschreibung der Versuche.

#### I. Zur Größenordnung der Umsätze.

Zu den im Nachstehenden beschriebenen Versuchen benutzten wir Muskelgewebe von Tauben, da nach Battelli und Stern dieses Material das reichste an Succino-Oxydase ist.

1. Frisch entnommenes Muskelgewebe wird 5 Stdn. liegen gelassen, dann in der Fleisch-Hackmaschine zerkleinert und 3-mal mit dem 3-fachen Volumen Wasser während je 15 Min. gewaschen. Das ausgewaschene Material wird auf ein Tuch gebracht und im Buchnerschen Trichter scharf abgesaugt.

a) Sauerstoff-Versuch: 60 ccm mit Kalilauge auf  $p_H = 7.6$  neutralisierter 1-proz. Bernsteinsäure-Lösung werden in einen 150 ccm fassenden Kolben gegeben und in einem mit Schüttelvorrichtung versehenen, auf  $38^0$  eingestellten Thermostaten vorgewärmt. Nach Eintragen von 20 g Muskelgewebe wird der Kolben evakuiert, mit Sauerstoff gefüllt und mit einer Sauerstoff enthaltenden Gas-Bürette verbunden. Nach Ausgleichung der Temperatur wird die Schüttelvorrichtung in Gang gesetzt und die Sauerstoff-Absorption alle 5 Min. abgelesen. Gleichzeitig mit dem Hauptversuch wird ein Kontrollversuch mit 60 ccm Wasser an Stelle der Bernsteinsäure-Lösung ausgeführt.

In nachstehender Tabelle sind die in Anwesenheit von Bernsteinsäure aufgenommenen Sauerstoff-Mengen in ccm (reduziert auf  $0^0$  und 760 mm) angegeben. Im Kontrollversuch wurde keine Sauerstoff-Absorption beobachtet.

|                              |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Zeit in Min. ....            | 5     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
| Absorb. Sauerstoff in ccm .. | 16.80 | 26.88 | 31.92 | 34.36 | 35.08 | 36.12 |

b) Methylenblau-Versuch: Mit dem gleichen Material wurden Methylenblau-Versuche in Vakuum-Röhren nach den Vorschriften Thunbergs vorgenommen. 4 Thunbergsche Vakuum-Röhren erhielten je 1 g ausgewaschenes Muskelgewebe, 3 ccm neutralisierte 1-proz. Bernsteinsäure und steigende Mengen Methylenblau in 3 ccm Wasser. Gleichzeitig wurde ein Kontrollversuch ohne Bernsteinsäure-Zusatz angestellt.

Die bis zur völligen Entfärbung der Gemische verfloßenen Zeiten wurden notiert:

|  |                |     |     |     |
|--|----------------|-----|-----|-----|
| Methylenblau-Zusatz in mg. (Kontrollversuch) | 0.1            | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| Entfärbungszeit in Min. ....                 | nicht entfärbt | 12' | 20' | 34' |
|  | nach 180'      |     |     | 48' |

Berechnet man die auf den Sauerstoff (a) und auf das Methylenblau (b) in 20 Min. pro g Muskelgewebe übertragenen Wasserstoff-Mengen, so ergibt sich:

$$a) 0.303 \text{ mg, } b) 0.001 \text{ mg, } a/b = 303.$$

Die Versuche wurden mit verschiedenen Muskelpräparaten mehrmals wiederholt. Hier seien nur einige Resultate angeführt.

|   | Absorbierter Sauerstoff | Entfärbtes Methylenblau | Entfärbungs-Zeit | a/b |
|---|-------------------------|-------------------------|------------------|-----|
| 2 | 2.39 mg                 | 0.2 mg                  | 23'              | 299 |
| 3 | 2.47 mg                 | 0.2 mg                  | 19'              | 308 |
| 4 | 2.25 mg                 | 0.2 mg                  | 17'              | 281 |
| 5 | 2.27 mg                 | 0.2 mg                  | 22'              | 281 |

In gleichen Zeitabschnitten wird auf den Sauerstoff pro g Muskelgewebe etwa 300-mal so viel Wasserstoff wie auf das Methylenblau übertragen.

## II. Zur Beeinflussung durch die H-Konzentration.

6. 3 Thunbergsche Vakuum-Röhren erhielten je 1 g gewaschenes Muskelgewebe (Taube), 1 ccm Methylenblau-Lösung (1:5000) und folgende Zusätze: Röhre a 4 ccm neutralisierte 1-proz. Bernsteinsäure, Röhre b 4 ccm Phosphat-Gemisch vom  $p_H = 7.6$ , Röhre c 4 ccm Wasser. Die Gemische wurden im Thermostaten bei  $40^0$  gehalten und die Entfärbungs-Zeiten notiert.

Entfärbungs-Zeit: a) 18', b) 16', c) nicht entfärbt nach 3 Stdn.

7. Zerkleinertes Muskelgewebe (Rind), 2-mal mit dem 3-fachen Vol. Wasser je 15 Min. gewaschen. Versuchs-Anordnung wie oben.

Entfärbungs-Zeit: a) 12', b) 15', c) nicht entfärbt.

Dasselbe zerkleinerte Material nach 24 Stdn. langem Aufbewahren bei Zimmer-Temperatur:

Entfärbungs-Zeit: a) 70', b) 65', c) nicht entfärbt.

8. 5 g Muskelgewebe (Rind) werden mit 5 ccm Methylenblau-Lösung vermischt und nach erfolgter Adsorption des Farbstoffs abgepreßt. In 3 Thunbergsche Röhren werden je 5 g auf diese Weise gefärbtes Muskelgewebe gegeben. Röhre a erhält außerdem 25 ccm Phosphat-Gemisch von  $p_H = 7.6$ , Röhre b 25 ccm neutralisierte Bernsteinsäure-Lösung, Röhre c 25 ccm Wasser.

Entfärbungs-Zeit: a) 28', b) 30', c) nicht entfärbt nach 3 Stdn.

9. Vorbereitung des Materials und Versuchs-Anordnung wie oben. Zusätze: a) 25 ccm Borat-Gemisch nach Clark  $p_H = 7.8$ ; b) 25 ccm neutralisierte Bernsteinsäure-Lösung; c) 25 ccm Wasser.

Entfärbungs-Zeit: a) 33', b) 28', c) nicht entfärbt nach 3 Stdn.

Versuche 6—9 beweisen also, daß bei gleichem  $p_H$  Methylenblau in Gegenwart von gewaschenem Muskelgewebe durch Phosphat- und Borat-Gemische praktisch mit derselben Geschwindigkeit wie durch Succinat-Lösungen entfärbt wird.

10. Sauerstoff-Versuch mit je 20 g Muskelgewebe (Tauben) und a) 60 ccm neutralisierter Bernsteinsäure-Lösung, b) 60 ccm Phosphat-Gemisch  $p_H = 7.6$ . Versuchs-Anordnung wie unter 1a.

|                                   |       |          |                           |    |    |    |
|-----------------------------------|-------|----------|---------------------------|----|----|----|
| Zeit in Minuten .....             | 10    | 15       | 20                        | 25 | 30 | 35 |
| Absorbierter Sauerstoff in ccm .. | a) 20 | 32       | 43                        | 48 | 49 | 49 |
| nicht reduziert                   |       | b) keine | neennenswerte Absorption. |    |    |    |

### III. Zur Beeinflussung durch Salze.

11. Es wurden folgende Gemische dargestellt:

|   | Entfärbungs-Zeit               |
|---|--------------------------------|
| a) 1 g Muskel (Tauben) + 5 ccm Phosphat-Gemisch $p_H = 7.4$ ..... | 17'                            |
| b) 1 g „ + 5 ccm Succinat .....                                   | 15'                            |
| c) 1 g „ + 2.5 ccm Phosphat + 2.5 ccm Succinat ...                | 18'                            |
| d) 1 g „ + 1 ccm Phosphat + 4 ccm Wasser .....                    | 23'                            |
| e) 1 g „ + 5 ccm Wasser .....                                     | nicht entfärbt<br>nach 3 Stdn. |

12. Zerkleinerter Frosch-Muskel, 2-mal mit dem 20-fachen Vol. Wasser ausgewaschen:

|  | Entfärbungs-Zeit |
|--|------------------|
| a) 1 g Muskel + 5 ccm Phosphat-Gemisch $p_H = 7.4$ ..... | 80'              |
| b) 1 g „ + 1 ccm „ + 4 ccm Natriumacetat. .              | 85'              |
| c) 1 g „ + 1 ccm „ + 4 ccm Kaliumcitrat ...              | 90'              |
| d) 1 g „ + 1 ccm „ + 4 ccm Natriumbutyrat                | nicht entfärbt   |
| e) 1 g „ + 5 ccm Wasser .....                            | nicht entfärbt   |

13. Gewaschener Muskel (Tauben):

- a) 25 g Muskel + 75 ccm neutralisierte Bernsteinsäure-Lösung,  
b) 25 g „ + 75 ccm Chlorkalium-Lösung (0.1-n.).

|                                   |        |                  |    |    |    |    |    |
|-----------------------------------|--------|------------------|----|----|----|----|----|
| Zeit in Minuten .....             | 5      | 10               | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 |
| Absorbierter Sauerstoff in ccm .. | {a) 18 | 32               | 48 | 60 | 66 | 68 | 70 |
|                                   | {b)    | keine Absorption |    |    |    |    |    |

## 147. Paul Baumgarten und Walter Kärgel: Über eine Synthese von 2.4-Dioxy-chinolin.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 14. Februar 1927.)

Die in Rede stehende Synthese war das Resultat von Untersuchungen, die an Dianiliden der Malonsäuren bei Erhitzung auf Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes gemacht wurden. Als zum Studium besonders geeignet erwiesen sich die Dianilide substituierter Malonsäuren, und unter ihnen nahm das Dianilid der Phenyl-malonsäure wegen der Leichtigkeit, mit welcher die zu beobachtenden Erscheinungen eintraten, und auch aus Gründen präparativer Natur eine besondere Rolle ein.

Beim Erhitzen im Vakuum, wenige Grade über seinen Schmelzpunkt hinaus, erleidet dieses Dianilid einen Zerfall, welcher, von einer untergeordneten Nebenreaktion abgesehen, hauptsächlich zu zwei Produkten führt. Als das eine konnte Anilin festgestellt werden; das andere war eine weiße, krystallinische Substanz. Die Mengenverhältnisse, in welchen beide