

77% und bei der niedrigeren Intensität 89% der Lichtwirkung zum Verschwinden.

Auf Grund dieses Ergebnisses, das den Weg über die Kohlensäure beweist, ist der Mechanismus der Photosynthese unterhalb und oberhalb des Kompensationspunktes der gleiche, und es ist gleichgültig, auf welcher Seite des Kompensationspunktes man die Ausbeute bestimmt.

6. Quantenbedarf im diffusen Licht

Die Bestimmung des in die Manometriegefäße eingestrahnten diffusen Lichts, die mit dem Bolometer nicht möglich ist, war leicht mit Hilfe des Aktinometers, wie in Abschnitt 2 erläutert. Die allgemeine Versuchsanordnung ergibt sich aus Abb. 1, aus der die beiden geordneten Lichtstrahlen wegzudenken sind. Ein Versuchsbeispiel ist in der Tab. 2 wiedergegeben.

Bedenkt man, daß die Tageslichtlampe 20% Blaugrün enthält, von dem nur etwa die Hälfte von dem Chlorophyll absorbiert wird, so erhält man die $1/\varphi$ -Werte für das vom Chlorophyll absorbierte Licht, indem man die gemessenen, in Tabelle 2 verzeichneten $1/\varphi$ -Werte mit 0,9 multipliziert. Dann sind die $1/\varphi$ -Werte

J [mm ³ Quanten pro Min.]	$1/\varphi$ gemessen	$1/\varphi$ auf Chlorophyll- absorption umgerechnet
16	6,57	5,92
8,27	4,75	4,28
4,18	4,0	3,60

Trägt man die auf Chlorophyllabsorption umgerechneten $1/\varphi$ -Werte als Funktion der Quantenintensität J

auf, so erhält man die Kurve der Abb. 2 (vgl. Einleitung), die die Ordinatenachse bei $1/\varphi = 3,06$ schneidet. Der Grenzwert von $1/\varphi$ für $J = 0$ ist also 3,06.

7. Quantenbedarf im geordneten Licht (Lichtinkrement)

Die Bestimmung des in die Zellen eingestrahnten geordneten Lichts geschah bolometrisch, wie in Abschnitt 3 erläutert. Steht kein Bolometer zur Verfügung, so kann auch das geordnete Licht mit dem Aktinometer gemessen werden. Die allgemeine Versuchsanordnung ist aus Abb. 1 ersichtlich. Es ist hervorzuheben, daß die Kompensationslampe während der ganzen Versuchszeit eingeschaltet blieb, während das geordnete Licht in geeigneten Zeitperioden hinzugefügt oder wieder fortgenommen wurde.

Ein Versuchsbeispiel, bei dem das geordnete Licht grünes Licht war, ist in Tab. 3 zahlenmäßig und in Abb. 4 (Einleitung) graphisch wiedergegeben.

Trägt man die nach Tab. 3 erhaltenen $1/\varphi$ -Werte als Funktion der eingestrahnten Quantenintensität auf, so erhält man eine fast gerade Linie (Kurve in Einleitung), die bei $1/\varphi = 2,8$ die Ordinatenachse schneidet. Der Grenzwert von $1/\varphi$ für $J = 0$ ist also 2,8. Wie in der Einleitung erläutert, ist dies nahezu der energetisch mögliche Wert. Eine Korrektur für Chlorophyllabsorption war hier nicht anzubringen, da der Spektralbezirk des Inkrements nur vom Chlorophyll absorbiert wurde.

Im Rot (610–675 m μ) wurden die gleichen Ausbeuten erhalten.

Glykolsäurebildung in *Chlorella*

VON OTTO WARBURG und GÜNTER KRIPPAHL

Aus dem Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforsch. 15 b, 197–199 [1960]; eingegangen am 27. Januar 1960)

Unter geeigneten Bedingungen erhält man bei der Photosynthese von *Chlorella* eine dem Kohlen säureverbrauch äquivalente Menge an Glykolsäure.

Glykolsäurebildung bei der Photosynthese von *Chlorella* ergab sich zuerst aus assimilatorischen Quotienten, die vielfach den Wert 1,33 erreichten¹. Später wurde diese Glykolsäurebildung durch analytischen Nachweis von TOLBERT² bestätigt. Im folgenden wird gezeigt, daß bei der Photosynthese von *Chlorella* unter geeigneten Versuchsbedingungen die dem Kohlen säureverbrauch äquivalente Menge an Glykolsäure erscheint. Reduktion der Kohlensäure und Oxydation des Kohlensäure-Reduktionsprodukts konkurrieren

dabei um ein oxydierendes Ferment — ein neues Argument zugunsten der Auffassung, daß die Kohlensäure bei der Photosynthese zunächst oxydiert werden muß, damit sie durch O₂-Entwicklung reduziert werden kann³.

Das Ergebnis von TOLBERT (l. c.), daß die Glykolsäurebildung Bicarbonat in der Außenflüssigkeit erfordert, können wir nicht bestätigen. Bei den meisten unserer Versuche war die *Chlorella* in saurem Phosphat (p_H 4,3) suspendiert.

Die Herstellung definierter niedriger CO₂-Drucke

Dies war ein wesentliches Erfordernis dieser Arbeit. Wir benutzten dazu Carbonat-Bicarbonat-

¹ O. WARBURG u. DEAN BURK, Arch. Biochemistry 25, 411 [1950].

² N. E. TOLBERT, J. biol. Chemistry 222, 895 [1956].

³ O. WARBURG, G. KRIPPAHL, H. S. GEWITZ u. W. VÖLKER, Z. Naturforsch. 14 b, 712 [1959].

gemische⁴, die bei 20° die folgenden berechneten CO₂-Drucke ergaben:

$\frac{m}{5}$ -NaHCO ₃	$\frac{m}{5}$ -Na ₂ CO ₃	CO ₂ -Drucke in mm Brodie
15	85	0,28
25	75	0,88
50	50	5,24
75	25	23,0
85	15	49,0
95	5	173

Die Zellen wurden entweder in den Gemischen suspendiert, wobei sich dann die Zellen in einem unphysiologischen alkalischen Medium befanden, oder aber es wurden, unter Benutzung der neuen Wannengefäße⁵, die Zellsuspensionen und Carbonatgemische räumlich getrennt. In die Wanne gaben wir die Zellen in ihrem normalen sauren Kulturmedium von p_H 4,3, während die Carbonatgemische auf den Boden der Gefäße gegeben wurden und von hier aus im Gasraum und in den Zellen die gewünschten Kohlensäuredrucke erzeugten.

Bestimmung der Glykolsäure

Glykolsäure wurde kolorimetrisch mit 2.7-Dihydroxynaphthalin nach EEGRIWE⁶ bestimmt. 10 mg des Reagens wurden in 100 cm³ reiner konzentrierter Schwefelsäure jeden Tag frisch gelöst. Zu 0,2 cm³ der x-Lösung, die etwa 0,01 μ Mol Glykolsäure enthalten soll, wurden 3 cm³ des Reagens gegeben

Im Hauptraum	KOH	50 $\frac{m}{5}$ -NaHCO ₃ 50 $\frac{m}{5}$ -Na ₂ CO ₃	85 $\frac{m}{5}$ -NaHCO ₃ 15 $\frac{m}{5}$ -Na ₂ CO ₃	95 $\frac{m}{5}$ -NaHCO ₃ 5 $\frac{m}{5}$ -Na ₂ CO ₃
CO ₂ -Druck mm Brodie	fast Null	5,24	49,0	173
μ Mole Glykolsäure in 60 Min.	0,05	0,15	0,08	0,005
O ₂ -Entwicklung in 60 Min. mm Brodie	—	+11,5	+21	+33

Abb. 1 ist eine graphische Darstellung des Versuchs. Das Maximum der Glykolsäurebildung liegt bei 5 mm Brodie und fällt nicht mit dem Maximum der O₂-Entwicklung zusammen. Bei einem Kohlen-

und damit 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, wobei eine rotviolette Färbung entstand, die im UV violett fluoresziert. Die Methode wurde kontrolliert durch Extraktion der Glykolsäure mit Äther nach Clausen und Analyse des Calciumsalzes.

Bei den Versuchen mit *Chlorella* konnte die Glykolsäure im allgemeinen direkt in der Außenflüssigkeit nach Abzentrifugieren der *Chlorella* bestimmt werden, störende Verunreinigungen erkennt man an der unreinen Farbe und der Unreinheit des Fluoreszenzlichts. Dann mußte, z. B. wenn der *Chlorella*-Suspension Zucker zugesetzt war, die Glykolsäure zunächst im Clausen-Apparat extrahiert werden, nötigerweise nach Enteiweißung mit Metaphosphat.

Abhängigkeit der Glykolsäurebildung vom Kohlensäuredruck

In den Hauptraum von 4 kegelförmigen Wannengefäßen wurden je 3 cm³ Kalilauge oder Carbonatgemisch gegeben, in den Gasraum Sauerstoff, in die Wanne je 2 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 0,4 cm³ m/50-Phosphat p_H 4,3. Nachdem bei 20° 800 mm³ Quanten pro Min. (weißes Licht) eingestrahlt worden waren, wurde aus dem Inhalt der Wannen die *Chlorella* herauszentrifugiert und im Überstand die Glykolsäure kolorimetrisch bestimmt, was trotz der eingesetzten sehr kleinen Zellmenge wegen der großen Empfindlichkeit der Glykolsäurereaktion gut möglich war.

Wir fanden:

säuredruck von 173 mm Brodie werden nur noch Spuren von Glykolsäure gebildet.

Ausbeute an Glykolsäure

Wenn die Glykolsäure aus der im Licht reduzierten Kohlensäure entsteht, so kann maximal 1 Molekül Glykolsäure entstehen, wenn 2 Moleküle Kohlen-

⁴ O. WARBURG, Biochem. Z. **100**, 230 [1919].

⁵ O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, Z. Naturforschg. **14b**, 561 [1959].

⁶ E. EEGRIWE, Z. analytische Chemie **89**, 123 [1932] sowie FRITZ FEIGL, Spot Tests, Elsevier, Amsterdam 1954.

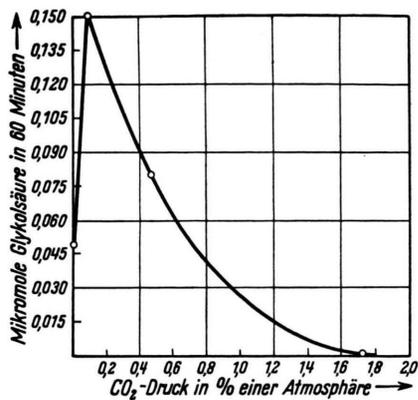


Abb. 1. Abhängigkeit der Glykolsäurebildung vom CO₂-Druck. Medium: *m/50-KH₂PO₄*, pH 4,3.

säure im Licht verbraucht werden. Nach den Ergebnissen des vorigen Abschnitts kann diese maximale Ausbeute an Glykolsäure nur erwartet werden, wenn der Kohlensäuredruck so niedrig ist, daß er die Glykolsäurebildung noch nicht hemmt. Ein geeigneter Kohlensäuredruck war 5 mm Brodie, der durch *m/5*-Carbonat-Bicarbonatgemisch 50 + 50 erzeugt wird. In den Hauptraum eines Manometriegefäßes wurden 100 mm³ *Chlorella* gegeben, suspendiert in 3 cm³ des Gemischs 50 + 50. Der Gasraum enthielt reinen Sauerstoff, die Temperatur war 20°, die eingestrahlte Intensität an weißem Licht betrug 800 mm³ Quanten pro Minute. Nach 60 und 120 Min. wurde der entwickelte Sauerstoff am Manometer abgelesen. Im Überstand der Zellen wurde die Glykolsäure bestimmt, $x_{O_2} + (Glykolsäure/2)$ ergab den CO₂-Verbrauch x_{CO_2} . Wir fanden:

	nach 60 Min. [μ Mole]	nach 120 Min. [μ Mole]
O ₂ entwickelt (x_{O_2})	12,6	23,5
Glykolsäure gebildet	9,0	18,0
CO ₂ verbraucht (x_{CO_2})	$12,6 + \frac{9}{2} = 17,1$	$23,5 + \frac{18}{2} = 32,5$
$-\text{CO}_2$	$\frac{17}{9} = 1,9$	$\frac{32,5}{18} = 1,8$
+ Glykolsäure		

Im Mittel wurden also 1,85 μMole Kohlensäure verbraucht, wenn 1 Molekül Glykolsäure erschien. Die Ausbeute an Glykolsäure war also 92% der Theorie.

Zeitliche Trennung von Reduktion der Kohlensäure und Bildung von Glykolsäure

Damit *Chlorella* Glykolsäure produziert, sind ein hoher Sauerstoffdruck, ein niedriger Kohlensäuredruck und intensive Belichtung notwendig, was durch den folgenden Versuch und seine graphische Darstellung in Abb. 2 anschaulich demonstriert wird.

In den Hauptraum von 4 Manometriegefäßes wurden 200 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ *m/50*-Phosphat pH 4,3, gegeben. Der Gasraum enthielt 2 Vol.-% CO₂-O₂, was bei den Abmessungen der Gefäße ($v \sim 18 \text{ cm}^3$) bedeutete, daß jedes Gefäß etwa 15 μMole Kohlensäure enthielt. Die Temperatur war 20°. Eingestrahlt wurde weißes Licht der Intensität 800 mm³ Quanten pro Min., das ist soviel, daß die Kohlensäure nach 15 Min. verbraucht war, wie der Umschlag positiver in negative Druckänderungen zeigte. Wurde nun im Abstand von 15 Min. je ein Gefäß herausgenommen und die Glykolsäure im Überstand der Zellen bestimmt, so wurde für die ersten 15 Min., wegen des Kohlensäuredrucks, fast keine Glykolsäurebildung gefunden. War aber die Kohlensäure verbraucht, so setzte eine starke Glykolsäurebildung ein, bis etwa für 2 Moleküle der verbrauchten Kohlensäure 1 Molekül Glykolsäure erschienen war; dann folgte eine langsame Glykolsäurebildung, wahrscheinlich aus der Atmungskohlensäure (Abb. 2).

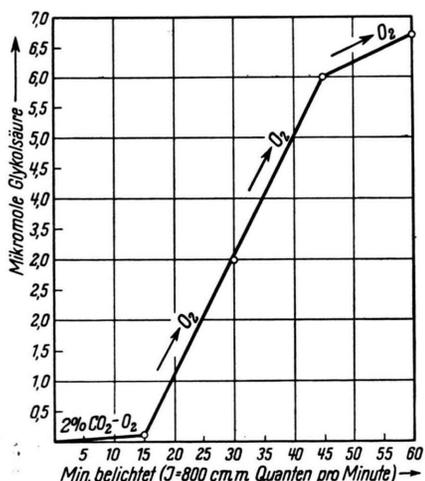


Abb. 2. Zeitliche Trennung von Kohlensäure-Reduktion und Glykolsäurebildung. *m/50-KH₂PO₄*, pH 4,3.