

# Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese II

## Gesteigerter Glucoseeinbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung

VON OTTO KANDLER

Aus dem Botanischen Institut der Universität München  
(Z. Naturforsch. 9b, 625—644 [1954]; eingegangen am 28. Juni 1954)

Bei verarmten Suspensionen von *Chlorella pyrenoidosa* wurde der Glucoseeinbau im Dunkeln und im Licht in Abhängigkeit von verschiedenen Außenbedingungen untersucht. Dabei ergab sich, daß in einem  $p_{\text{H}}$ -Bereich von 5,0 bis 7,5 im Licht bis zu 25% mehr Glucose aus der Suspensionsflüssigkeit aufgenommen wurde als im Dunkeln. Dieser vermehrte Einbau von Glucose hält aber nur einige Stdn. an, sinkt laufend ab und nach etwa 8 Stdn. bewirkt das Licht eine Hemmung der Glucoseaufnahme. Im Alkalischen bewirkt Belichtung stets eine Verminderung der Glucoseaufnahme. Allerdings ist unter diesen Bedingungen auch die oxydative Assimilation erheblich herabgesetzt.

Die gesteigerte Glucoseaufnahme im Licht tritt bei frisch geernteten oder mit Glucose vorgefütterten Algen nicht auf. Wird dagegen gleichzeitig mit Glucose und Nitrat vorgefüttert, so bleibt der Effekt, wenn auch vermindert, erhalten.

Unter anaeroben Bedingungen wird im saueren  $p_{\text{H}}$ -Bereich bei Belichtung ebenfalls Glucose bis zu 85% des unter  $\text{O}_2$  gemessenen Betrages eingebaut. Durch anaerobe Vorbehandlung der Algen im Dunkeln wird sowohl die  $\text{O}_2$ -Entwicklung als auch der Glucoseeinbau reversibel gehemmt.

Es wird angenommen, daß bei verarmten Algen der Glucoseeinbau durch den Vorrat an ATP begrenzt ist und durch zusätzliche ATP-Lieferung im Zusammenhang mit der Photosynthese bis zur Sättigung der Hexokinase bzw. der Phosphorylase gesteigert werden kann. Bei längerer Belichtung bzw. Vorfütterung stauen sich Assimilationsprodukte auf und vermindern die Durchsatzgeschwindigkeit des Fermentsystems, so daß die ATP nicht mehr Minimumfaktor und damit für die Reaktionsgeschwindigkeit unwichtig ist. Bei verarmten Chlorellen kann daher der gesteigerte Glucoseeinbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung aufgefaßt werden.

Durch eine Reihe von Untersuchungen der letzten Jahre (Kandler<sup>1</sup>, Strehler und Totter<sup>2</sup>, Holzer<sup>3</sup>, Grube<sup>4</sup>, Simonis und Grube<sup>5</sup>), die an verschiedenen Objekten mit unterschiedlicher Methodik recht gut übereinstimmende Ergebnisse lieferten, ist die Beteiligung von Phosphorylierungsvorgängen an der Photosynthese gesichert worden. Es erscheint mir daher heute von besonderem Interesse, einige Konsequenzen, die sich aus diesen Vorstellungen ableiten, experimentell zu überprüfen, um dadurch der Grundfrage nach dem Mechanismus der  $\sim\text{ph}$ -Entstehung im Zusammenhang mit der Photosynthese näher zu kommen.

Im Zusammenhang mit den früheren Untersuchungen (Kandler<sup>1</sup>) war die Vorstellung entwickelt

worden, daß der bei der Photosynthese entstehende H hohen Potentials nach dem Typus der Atmungsketten-Phosphorylierung beim Übergang auf niedrigeres Potential, eventuell sogar bei Rekombination mit  $\text{O}_2$ , energiereiche Phosphatbindungen liefert. Diese könnten dann zu den verschiedensten Syntheseleistungen im Organismus verwendet werden und blieben nicht für den  $\text{CO}_2$ -Einbau vorbehalten.

Eine relativ einfache und auch methodisch leicht erfaßbare Syntheseleistung der Pflanzen ist der Aufbau von Polysacchariden aus Glucose. Besonders bei Mikroorganismen ist die oxydative Assimilation gut untersucht (Siegel und Clifton<sup>6</sup>). Myers<sup>7</sup> und Taylor<sup>8</sup> konnten zeigen, daß auch *Chlorella* bzw. *Scenedesmus* mit sehr guter Ausbeute Glucose

<sup>1</sup> O. Kandler, Z. Naturforsch. 5b, 423 [1950].

<sup>2</sup> B. L. Strehler u. J. R. Totter, Arch. Biochem. Biophysics 40, 39 [1952]; E. C. Wassink, J. F. G. M. Wintermans u. J. E. Tjia, Proc. [Amsterdam] Serie C 54, 3 [1951]; 54, 496 [1951]; J. F. G. M. Wintermans u. J. E. Tjia, ebenda 55, 34 [1952].

<sup>3</sup> H. Holzer, Z. Naturforsch. 6b, 424 [1951].

<sup>4</sup> K. H. Grube, Planta 42, 279 [1953].

<sup>5</sup> W. Simonis u. K. H. Grube, Z. Naturforsch. 8b, 312 [1953].

<sup>6</sup> B. V. Siegel u. C. E. Clifton, J. Bacteriol. 60, 573 [1950].

<sup>7</sup> J. Myers, J. gen. Physiol. 30, 217 [1947].

<sup>8</sup> F. J. Taylor, J. exp. Bot. 1, 302 [1951].

einbauen. Nur  $\frac{1}{6}$  des theoretischen  $O_2$ -Verbrauchs ist bei diesen Algen notwendig, um 1 mg Glucose aus der Nährlösung zum Verschwinden zu bringen. Es werden also etwa  $\frac{5}{6}$  der aufgenommenen Glucose in die Zelle eingebaut. Taylor fand bei *Scenedesmus* 80—90% dieser eingebauten Glucose als Polysaccharid wieder und nahm an, daß der Rest zu anderen Substanzen, wie Aminosäuren und Fetten, umgebaut worden ist.

Belichtet man Algen während des Glucoseumsatzes, so erwartet man, daß die photosynthetisch gebildete Glucose mit der von außen aufgenommenen Glucose um den Aufbau zu Polysacchariden konkurriert. Daraus müßte eine Verzögerung der Glucoseabnahme in der Außenlösung entstehen. Natürlich ist das nur dann der Fall, wenn die am Polysaccharidaufbau beteiligten Fermente bereits durch die oxydative Assimilation gesättigt sind.

Experimentelle Untersuchungen über die kombinierte Wirkung von Glucosefütterung und Belichtung liegen nur wenige vor. Iggena<sup>9</sup>, die das Wachstum verschiedener Algen unter diesen Bedingungen untersuchte, konnte eindeutig eine klare Förderung der Kombinationswirkung gegenüber der Wirkung der Einzelfaktoren, also nur Glucose oder nur Licht, feststellen. Quantitative Versuche über den Glucoseeinbau im Lichte führte nur Myers<sup>7</sup> aus. Sowohl unter Schwach- wie unter Starklichtbedingungen verschwand die zu Chlorellen zugesetzte Glucose gleich schnell wie in den Dunkelproben. Dieses Ergebnis war überraschend und Myers<sup>7</sup> folgerte daraus, daß Glucose nicht als Assimilationsprodukt in Frage kommt, weil eben sonst die erwähnte Hemmung auftreten müßte. Dieser Schluß erscheint jedoch reichlich gewaltsam, denn daß im Laufe der Photosynthese Polysaccharid, das aus Glucose aufgebaut ist, entsteht, gehört wohl zu den wenigen unerschütterlichen Grundtatsachen der Photosyntheseforschung.

Nach den neueren Vorstellungen (vgl. Pirson<sup>10</sup>, Holzer<sup>11</sup>, Brown und Frenkel<sup>12</sup>) entsteht nicht freie Glucose, sondern Glucosephosphat im Laufe der Photosynthese. Wenn nun der begrenzende Faktor für die Geschwindigkeit des Glucoseeinbaues nicht in der Bildung von Polysaccharid aus Glucosephosphat, sondern in der Bildung des Glucosephosphats liegt, so wird in diesem Falle die oxydative

Assimilation in keiner Weise durch die  $CO_2$ -Assimilation gestört, was mit Myers Befunden im Einklang steht. Es wäre weiterhin denkbar, daß bei der Bildung von Glucosephosphat nicht die Hexokinase, sondern der Vorrat an ATP den Minimumfaktor darstellt. Dann müßte eine Bildung von frei verfügbarem  $\sim$ ph durch die Photosynthese sogar zu einer Beschleunigung des Glucoseeinbaues führen. Dieser „Lichteinbau“ von Glucose könnte dann als Testreaktion für eine nähere Analyse der lichtbedingten Phosphorylierung dienen.

Früher wurde wiederholt eine Atmungssteigerung durch Belichtung angenommen (vgl. Rabinowitch<sup>13</sup>). In neuerer Zeit konnte jedoch sowohl durch Versuche mit markiertem  $CO_2$  (Weigl und Mitarbb.<sup>14</sup>) als auch mit  $^{18}O$  (Brown<sup>15</sup>) gezeigt werden, daß keinerlei Steigerung der Atmung während der Photosynthese erfolgt, sondern unter bestimmten Bedingungen eher an eine Hemmung zu denken ist. Diese Befunde sind für die hier angeschnittenen Probleme von besonderer Bedeutung, weil damit die Möglichkeit ausgeschlossen wird, daß eine gesteigerte Glucoseaufnahme nur die Folge einer gesteigerten Atmung im Licht sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei *Chlorella pyrenoidosa* die Bedingungen ausfindig zu machen, unter denen tatsächlich ein durch Lichtenergie betriebener Einbau von Glucose nachgewiesen werden kann.

#### Material und Methodik

a) Das Algenmaterial: Verwendet wurde der gleiche Stamm von *Chlorella pyrenoidosa* wie in der vorhergehenden Arbeit (Kandler<sup>1</sup>). Die Anzucht erfolgte in der ebenfalls bereits früher beschriebenen Nährlösung in großen Waschflaschen, die in einem gegen Tageslicht abgedunkelten Kellerraum bei 16—22°C von einer 100 Watt-Metallfadenlampe beleuchtet wurden. Die Beleuchtungsstärke betrug an der Flaschenoberfläche etwa 5000 Lux. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurden die Kulturgefäße durchlüftet, wobei der Luftstrom aus einer Druckflasche einen etwa 2-proz.  $CO_2$ -Zusatz erhielt. Nach 3 oder 4 Tagen waren die nach dem Einimpfen leicht hellgrünen Suspensionen dicht dunkelgrün und die Algen wurden in einer Zentrifuge bei ungefähr 2000 g sedimentiert. Nach wiederholtem Auswaschen mit dest. Wasser wurden die Algen erneut in dest. Wasser suspendiert und im Luftstrom in einer verdunkelten Flasche verarmt.

<sup>9</sup> M. L. Iggena, Arch. Mikrobiol. 9, 129 [1938].

<sup>10</sup> A. Pirson, Fortschr. Bot. 14, 289 [1952].

<sup>11</sup> H. Holzer, Angew. Chem. 66, 65 [1954].

<sup>12</sup> A. H. Brown u. A. W. Frenkel, Annu. Rev. Physiol. 4, 23 [1953].

<sup>13</sup> E. I. Rabinowitch, Photosynthesis and related Processes, Interscience Publishers, New York 1945.

<sup>14</sup> J. W. Weigl, P. M. Warrington u. M. Calvin, Amer. chem. Soc. 73, 5058 [1951].

<sup>15</sup> A. H. Brown, Amer. J. Bot. 40, 719 [1953].

Da die Massenkulturen nicht unter sterilen Bedingungen ausgeführt wurden, waren in den Rohkulturen stets Bakterien vorhanden, die sich aber bei der geringen Beschleunigung während des Zentrifugierens nur zu einem sehr geringen Teil absetzten und bei dem wiederholten Auswaschen vollkommen von den Algen abgetrennt wurden. Die Bakterienfreiheit wurde vor Beginn und nach Beendigung der Versuche stets sowohl im gefärbten Ausstrichpräparat als auch im hängenden Tropfen mit dem Phasenkontrast-Mikroskop überprüft. Wenn die Algen gelegentlich schlecht wuchsen, nahmen die Bakterien stark zu und waren nur schwer abzutrennen, da diese Algen im dest. Wasser leicht ausflockten. Kleinere Algenflocken, an denen vielfach lange Bakterienketten hingen, waren dann auch schon in der Kulturlösung zu finden. Derartiges Material wurde stets verworfen und

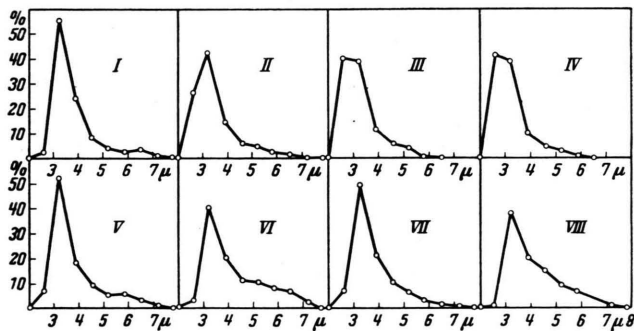


Abb. 1. Häufigkeitsverteilung von Zellgrößen nach verschiedener Vorbehandlung. (Jeweils 300 Zellen gemessen.) I. Erntetag; Teilungsstadien 3%. II. 20 h verarmt; Teilungsstadien 0,3%. III. 44 h verarmt; Teilungsstadien 0,1%. IV. 72 h verarmt; Teilungsstadien 0,0%. V. 44 h verarmt + 7 h Glucose; Teilungsstadien 0,1%. VI. 44 h verarmt + 24 h Glucose; Teilungsstadien 0,3%. VII. 44 h verarmt + 7 h Glucose +  $\text{NO}_3^-$ ; Teilungsstadien 1%. VIII. 44 h verarmt + 24 h Glucose +  $\text{NO}_3^-$ ; Teilungsstadien 6%.

das Impfmateriale wurde von Reinkulturen auf Nährsalzagar genommen. Bei gesundem Algenmateriale konnte selbst nach 8 Tagen keine Ausflockung in dest. Wasser beobachtet werden.

Tamiya und Mitarbb.<sup>16</sup> zeigten in eingehender Weise, daß die verschiedenen Entwicklungszustände der Chlorellen unterschiedliche physiologische Aktivität aufweisen. Diesem Gesichtspunkt ist bisher viel zu wenig Beachtung geschenkt worden, und manche Widersprüche, nicht zuletzt in der Frage nach der Quantenausbeute der Photosynthese, ließen sich vielleicht auflösen, wenn man allgemein einheitliches oder wenigstens in seinem physiologischen Zustand definiertes Algenmateriale verwenden würde. Tamiya und Mitarbb. unterscheiden im wesentlichen 2 Zelltypen: Die „Lichtzellen“, mit großem Zelldurchmesser, geringem Chlorophyllgehalt, hoher Atmungsintensität und geringer Photosynthese-Leistung und die „Dunkelzellen“ mit gerade entgegengesetzten

Eigenschaften. Die Lichtzellen sind im Gegensatz zu den Dunkelzellen teilungsfähig und entstehen nur im Licht durch Heranwachsen aus den Dunkelzellen.

Nach Tamiya und Mitarbb. zeigt die Häufigkeitsverteilung der Zelldurchmesser bei Schwachlicht-Kulturen (400 Lux) ein sehr hohes Maximum für den Anteil der kleinen Zellen (Dunkelzellen), während nur wenige Prozent Lichtzellen vorhanden sind. Bei Starklicht-Kulturen (25 000 Lux) ist die Verteilung umgekehrt. In den eigenen Kulturen ergab sich, wie Abb. 1 Kurve I zeigt, eine typische Schwachlicht-Verteilung. Die angegebene Beleuchtungsstärke von 5000 Lux gilt ja nur an der Oberfläche der Anzuchtflaschen, während im Inneren, also für die Mehrzahl der Algen besonders gegen Ende der Kulturdauer, erheblich geringere Belichtung herrschte. Im Laufe der Verarmung (Abb. 1, II—IV) treten immer mehr Algen mit einem Durchmesser von nur 2—3  $\mu$  auf, während die Zellen mit 6—9  $\mu$  Durchmesser, die normalerweise zur Vermehrung übergehen, vollkommen verschwinden. Die Teilungsstadien, die bei der Ernte mit 3% Häufigkeit auftraten, nehmen dementsprechend bis auf Null ab. Wenn nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben wird, wurden die Versuche immer mit Algen, die wenigstens 24 Stdn. meist jedoch 48 Stdn. verarmt waren, ausgeführt. Die Suspensionen enthielten also beinahe ausschließlich teilungsunfähige „Dunkelzellen“.

In einigen Versuchen wurden Algen verwendet, die nach 44-stdg. Verarmung 24 Stdn. mit Glucose bzw. Glucose +  $\text{NO}_3^-$  vorgefüttert worden waren. Dabei verändert sich die Häufigkeitsverteilung der Zelldurchmesser in typischer Weise, wie Abb. 1, V—VII zeigt. Bei Glucosefütterung verschwindet der Anteil der kleinsten Zellen vollkommen und die Zellen größeren Durchmessers nehmen stark zu, ohne daß ein wesentlicher Prozentsatz von Teilungsstadien auftritt. Dies ist verständlich, weil keine N-Quelle zur Proteinsynthese vorhanden ist. Der Chloroplast ist bei den verarmten Zellen schmal, erfüllt nur einen kleinen Teil der Zelle und die Zelle selbst ist leicht elliptisch. Bei den gefütterten Algen jedoch nimmt der Chloroplast wieder den größten Teil der Zelle ein und die Zellen sind normal rund. Bei gleichzeitiger Fütterung mit Nitrat setzt lebhafte Vermehrung ein und der Anteil der großen Zellen nimmt ebenfalls stark zu. Allerdings zeigt die Kurve einen ganz anderen Charakter, denn die oberen Größen stauen sich nun nicht wie bei der reinen Glucosefütterung an, sondern gehen zur Vermehrung über und liefern wieder je 8 kleine Aplanosporen, wodurch der Prozentsatz der kleinen Zellen auch unter diesen Bedingungen immer noch sehr hoch erhalten wird. Bei reiner Glucosefütterung verändert sich die Häufigkeitsverteilung auch bei Ausdehnung auf weitere 24 Stdn. nicht mehr wesentlich, da der N-Mangel ein weiteres Anwachsen auch der kleinen Zellen nicht gestattet. Offensichtlich sind die Zellen der kleinsten Kategorie des verarmten Materials durch die Fütterung zur 2. Kategorie aufgerückt, während die Zellen der 2. und 3. Kategorie die oberen Größenklassen auffüllten, soweit eben der N-Vorrat ein Wachstum erlaubte.

Wie die vielen Teilungsstadien nach  $\text{NO}_3^-$ -Fütterung zeigen, ist der Übergang von Dunkel- in Lichtzellen in keiner Weise vom Licht abhängig, wie Tamiya und

<sup>16</sup> H. Tamiya, T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase u. T. Nihei, *Biochim. biophysica Acta* **12**, 23 [1953].



	Parallelen						M	$\sigma$	$\sigma$ [%]
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
O <sub>2</sub> -Verbrauch in 3 Stunden . . .	870	870	844	852	878	836	858	16,7	1,95
$\Delta$ Glucose (Dunkel) in mg . . .	6,2	5,9	5,9	5,9	6,0	5,8	5,95	0,137	2,3
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt) . . .	140	147	143	144	146	144	144	2,45	1,7
O <sub>2</sub> -Produktion . . . . .	821	841	844	824	829	821	830	10,1	1,23
$\Delta$ Glucose (Licht) in mg . . .	6,9	7,0	7,0	6,7	7,1	6,9	6,93	0,136	1,96

Tab. 1. Daten für 6 gleichzeitig untersuchte Parallelproben. 48 Stdn. verarmte Algen, *m/45*-Phosphatpuffer  $p_{\text{H}}$  5,6, Belichtung: 2,0  $\mu\text{Mol}$  Quanten/min., Algenkonz.: 17 mg Trgew./Gefäß. O<sub>2</sub>-Angaben in cmm.

Mitarbb. annehmen, sondern nur eine Frage der Kohlenhydrat- und N-Versorgung. Diese Bezeichnung ist daher nicht ganz zutreffend und ich werde im Folgenden die Ausdrücke „verarmte Zellen“ für die Zustände Abb. 1, II—IV, „Kohlenhydrat-Stau-Zellen“ für Abb. 1, VI und „wachsende Zellen“ für Abb. 1, VIII benutzen. Die frisch geernteten Algen stellen ein Zwischenstadium zwischen wachsenden und verarmten Zellen dar. Da dieser Zustand schwer reproduzierbar ist, wurden frische Algen im allgemeinen nicht benutzt.

Gleichzeitig mit der Glucosefütterung ging die Farbe der Suspension von tiefem Dunkelgrün in gelblichgrün über. Dieser Effekt war bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitrat erheblich geringer. Dies entspricht dem Befund Tamiyas und Mitarbb., daß die „Lichtzellen“ geringeren Chlorophyllgehalt aufweisen. In den eigenen Kulturen wurde dieser Effekt bisher nicht genauer quantitativ untersucht. Er könnte aber vielleicht für die in neuerer Zeit häufig diskutierten Probleme der Photooxydation des Chlorophylls und anderer Ausbleichungsphänomene von Interesse sein.

#### b) Versuchsanordnung und Bestimmungsmethoden

Parallel zu allen Glucose-Einbauversuchen wurde der Gasstoffwechsel manometrisch am gleichen Material bestimmt. Dazu wurden die Algen in entsprechenden Pufferlösungen suspendiert und nach Zusatz von Glucose in Portionen von je 3 ccm in die Atmungsgefäße verteilt. Damit war sowohl gleiche Algenmasse als auch gleiche Glucosemenge in allen Proben gewährleistet. Bei Beginn der Atmungsmessung wurde eine Probe der Restsuspension abzentrifugiert und aus dem Überstehenden die Ausgangskonzentration der Glucose bestimmt. Bei Versuchsende wurden die Proben aus den Atmungsgefäßen ebenfalls abzentrifugiert und die Glucose bestimmt. Aus beiden Werten ergibt sich der Glucoseverbrauch in der Versuchszeit. Sollte das Trockengewicht bestimmt werden, so wurde das Sediment mehrmals gewaschen, um den Puffer zu entfernen, und dann im Trockenschrank bei 105°C getrocknet. Zusätze zu den einzelnen Proben, die nicht gemeinsam in die Ausgangssuspension gegeben werden konnten, wurden meist in 10-facher Endkonzentration in die Atmungsgefäße einpipettiert, wobei die

Leerproben einen entsprechenden Zusatz von dest. Wasser erhielten.

Bei den manometrischen Messungen wurden rechteckige Gefäße mit seitlich angesetztem Kipper benutzt, die entweder etwa 14 ccm oder 28 ccm Volumen besaßen. Die kleinen Gefäße wurden meist belichtet, die großen Gefäße durch Säckchen aus schwarzem Tuch verdunkelt.

Die Belichtung erfolgte mit einer Metallfadenlampe, die, in einem Kühler eingebaut, so im rechteckigen Thermostaten befestigt war, daß sie durch einen Trieb in der Höhe verstellbar war\*. Der Glühfaden war 60 cm lang und die Stromaufnahme betrug maximal 130 Watt. 7 Atmungsgefäße hatten über dem Faden gleichzeitig Platz und konnten gleichmäßig beleuchtet werden. Beim minimalsten Abstand der Gefäße vom Glühfaden und höchster Belastung der Lampe herrschte am Gefäßboden eine Beleuchtungsintensität von 10 000 Lux. Über 80% des Lichtes entfielen auf den roten Spektralbereich. Die in die Gefäße eingestrahelte und vom Chlorophyll absorbierte Lichtmenge wurde mit Hilfe des Aktinometers (Warburg und Schocken<sup>17</sup>) unter Verwendung von Chlorophyllid entsprechend den Angaben in der früheren Arbeit (Kandler<sup>1</sup>) bestimmt. Dabei wurde die Lampe so verschoben, daß im optimalen Meßbereich des Aktinometers gearbeitet werden konnte. Lichtstufungen innerhalb einer Versuchsreihe wurden durch Anbringen von Absorptionsgittern an den Gefäßen hergestellt und die Extinktion der Gitter ebenfalls aktinometrisch bestimmt. Tageslicht konnte durch eine Verdunkelungsvorrichtung am Thermostaten vollkommen ausgeschaltet werden. Die aktinometrische Ausmessung der Gefäße ergab eine Übereinstimmung des Lichtgenusses der einzelnen Gefäße bis auf 2 Prozent.

Einen Überblick über die Genauigkeit sowohl der manometrischen Messungen als auch der Bestimmung der Glucoseaufnahme mit Hilfe der beschriebenen Versuchsanordnung gibt Tab. 1, in der je 6 Parallelproben mit und ohne Belichtung zusammengestellt sind. Die O<sub>2</sub>-Produktion wurde dabei aus den Druckänderungen jedes einzelnen belichteten Gefäßes unter Zugrundelegung des durchschnittlichen O<sub>2</sub>-Verbrauches der Dunkelproben berechnet. Die Streuung für alle Größen liegt um 2% und ist damit erheblich niedriger als die Streuung, die durch Material verschiedener Ernten erwartet werden muß.

Die RQ-Bestimmung erfolgte entweder mit der 2-Ge-

\* Die Sonderanfertigung der Warburg-Apparatur erfolgte durch die Firma Bender u. Hobein, München.

<sup>17</sup> O. Warburg u. V. Schocken, Arch. Biochemistry 21, 363 [1948].



fäßmethode oder nach der Methode von Dixon und Keilin (vgl. Umbreit und Mitarbb.<sup>18</sup>).

Die Glucose wurde nach den Angaben von Folin und Wu<sup>19</sup> bestimmt: Zu 1 ccm Untersuchungslösung wurden 2 ccm einer Lösung A (40 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sicc., 400 ccm dest. Wasser, dazu 7,5 g Weinsäure und 4,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ad 1000) gegeben und 6 min im Wasserbad auf  $100^\circ$  erhitzt. Nach Abkühlen erfolgte Zugabe von 2 ccm einer Lösung B (35 g Molybdänsäureanhydrid, dazu 400 ccm 5-proz. NaOH, 30 min kochen, nach Abkühlen 125 ccm 85-proz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  hinzugießen und auf 500 ccm ergänzen) und nach Umschütteln und 10 min Wartezeit wurden noch 20 ccm Wasser zupipettiert. Der blaue Farbton wurde dann nach 40 min bei 578  $\text{m}\mu$  photometriert. Es wurden stets 2 Parallelproben analysiert und, wenn die Werte differierten, wiederholt.

### Versuchsergebnisse

#### 1. Manometrische Bestimmung des Glucose-Einbaues im Dunkeln und im Licht

Mehrere Tage im Dunkeln verarmte Chlorellen zeigen nur noch eine geringe Atmungsintensität, und der RQ ist von knapp über 1,0 am Erntetag auf 0,7–0,85 gefallen. Bei Zugabe von Glucose (Abb. 2) steigt der  $\text{O}_2$ -Verbrauch, auf die Zeiteinheit bezogen, rasch an und erreicht nach etwa  $1\frac{1}{2}$  Std. ein Optimum, das so lange beibehalten wird, bis die gesamte Glucose aus der Lösung verschwunden ist. Dann fällt er innerhalb von 5 min um etwa 30% ab und nähert sich im Verlaufe von 2 Std. asymptotisch dem Wert für die Leeratmung. Der steile Abfall der Glucoseatmung zeigt an, daß die Glucose bis zu sehr geringen Konzentrationen herab mit maximaler Geschwindigkeit umgesetzt wird. Die Atmungssteigerung gegenüber der Leeratmung beträgt am Erntetag etwa das 2–3-fache, nach längerer Verarmung jedoch bis zum 8-fachen.

Gleichzeitig mit dem Anstieg des  $\text{O}_2$ -Verbrauches erfolgt auch eine RQ-Erhöhung, die über den theoretischen RQ für Glucose von 1,0 hinausgeht und Werte von 1,2 bzw. 1,35 bei länger anhaltendem Glucoseumsatz erreicht. Daraus geht hervor, daß nicht nur Polysaccharide, sondern auch stärker hydrierte Verbindungen synthetisiert werden. Da weder während der Verarmung noch bei der Glucosefütterung N zur Verfügung stand, ist eine nennenswerte Eiweißsynthese nicht möglich. Wie Abb. 1 zeigte, erfolgt unter diesen Bedingungen auch kein

<sup>18</sup> W. W. Umbreit, R. H. Burries u. J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Minneapolis, Burgess Publishing 1949.

<sup>19</sup> G. Folin u. H. Wu, *J. biol. Chemistry* **41**, 367 [1920] sowie *J. biol. Chemistry* **82**, 83 [1929].

echtes Wachstum. Dagegen dürfte neben Polysacchariden Fett gebildet werden, was schon in geringem Umfang zu starken RQ-Erhöhungen führt. Fettspeicherung wurde bei *Chlorella* besonders unter N-Mangel wiederholt beobachtet (Aach<sup>20</sup>, vgl. Pirson<sup>21</sup>).

Daß zum Zeitpunkt des Atmungsabfalles tatsächlich die gesamte Glucose aus der Lösung verschwunden ist, wurde an Proben, die zu entsprechenden Zeiten entnommen und auf Restzucker analysiert wurden, festgestellt. Die Zuckeranalysen beruhen allerdings nur auf der reduzierenden Eigenschaft der Zucker, und es wäre denkbar, daß zwar kein Zucker mehr, wohl aber Abbauprodukte desselben noch vor-

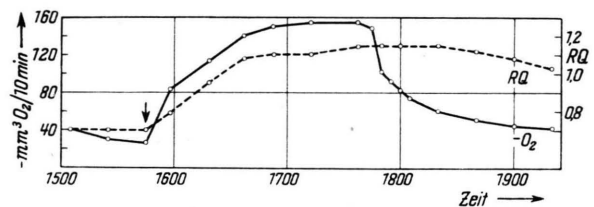


Abb. 2. Geschwindigkeit der  $\text{O}_2$ -Aufnahme und Verlauf des RQ während des Glucoseumsatzes. Der Abfall des  $\text{O}_2$ -Verbrauches zeigt den Verbrauch der Glucose an.

handen sind. Daher wurde an einigen Proben auch nasse Veraschung mit Bichromat und Schwefelsäure, bzw. eine Trockengewichtsbestimmung an der von den Algen abgetrennten Lösung vorgenommen. Es fanden sich aber weder wägbare noch oxydierbare Substanzen. Der gesamte Kohlenstoff der Glucose war also entweder als  $\text{CO}_2$  entwichen oder in die Zellen eingebaut worden.

Der Einbau von Glucose bewirkt eine Trockengewichtszunahme der Algen, die mindestens um 10% geringer sein muß als das Gewicht der eingebauten Glucose, da bei der Kondensation zu Polysaccharid Wasser austritt. Die Hydrierung eines Teiles der eingebauten Glucose bewirkt einen weiteren Gewichtsverlust. Die Bestimmung der Trockengewichtszunahme ermöglicht gemeinsam mit den manometrischen Messungen die Aufstellung einer Bilanz, wie es in Tab. 2 gezeigt wird. Bei diesem Versuch wurden zu je 3 ccm verarmter Algen 3,6 mg, 7,2 mg bzw. 10,8 mg Glucose aus dem seitlichen Ansatz zugekippt, und nach dem Atmungsabfall erfolgte die Trockengewichtsbestimmung der Algen. Die Kinetik der  $\text{O}_2$ -Aufnahme bei diesem Versuch ist in Abb. 3

<sup>20</sup> H. G. Aach, *Arch. Mikrobiol.* **17**, 213 [1952].

<sup>21</sup> A. Pirson, *Fortschr. Bot.* **12**, 247 [1949].

Zugesetzte Glucose	3,6 mg	7,2 mg	10,8 mg
— O <sub>2</sub> (gesamt) in ccm	383	735	1059
— O <sub>2</sub> (Leeratmung)	115	197	263
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt)	106	102	98
O <sub>2</sub> /mg Glucose (korrigiert)	74,5	75,0	74,0
Δ Trockengewicht in mg	2,7	5,1	7,4
RQ	1,15	1,20	1,22
CO <sub>2</sub> (gesamt)	440	880	1290
Veratmete Glucose (gesamt)	0,59	1,17	1,75
Veratmete Glucose (korrigiert)	0,46	0,96	1,44
S. W. (gesamt)	5,1	5,1	5,16
S. W. (korrigiert)	6,8	6,6	6,45

Tab. 2. Bilanz des Glucoseumsatzes bei gestufter Glucosemenge. Algen 48 Stdn. verarmt, *m/45*-Phosphatpuffer  $p_H$  6,0;  $t = 27^\circ C$ .

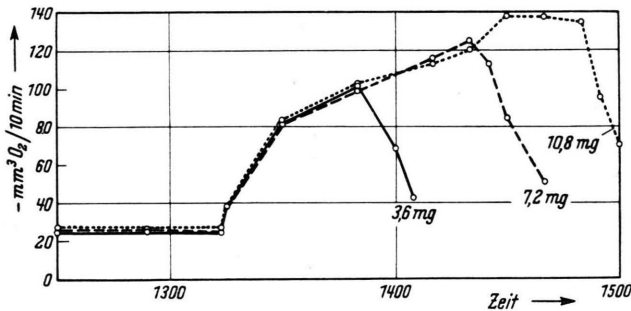


Abb. 3. Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme nach Zusatz verschiedener Glucosemengen.

dargestellt. Zur Berechnung der Bilanz wurde der O<sub>2</sub>-Verbrauch bis zum Beginn des Abfalls der Kurven herangezogen.

Bei der Berechnung des Wirkungsgrades der oxydativen Assimilation ergibt sich die Schwierigkeit, daß man nicht entscheiden kann, ob während des Glucoseumsatzes die Leeratmung weitergeht oder ob sie zugunsten der Glucoseatmung verdrängt wird. Taylor<sup>8</sup> nahm an, daß letzteres der Fall ist, da sich unter dieser Annahme konstantere Verhältnisse für den Quotienten O<sub>2</sub>/mg Glucose ergaben. In den hier angeführten Versuchen wird stets beiden Möglichkeiten Rechnung getragen und sowohl der O<sub>2</sub>-Verbrauch pro mg aufgenommenener Glucose als auch der synthetische Wirkungsgrad auf die Gesamtatmung und auf die durch Abzug der Leeratmung korrigierte Glucoseatmung bezogen. In den meisten Fällen werden bei der 2. Berechnungsart die konstanteren Werte erreicht. Für die in dieser Arbeit interessierenden Fragen ist eine Entscheidung, welche der Berechnungsarten die zutreffendere ist, nicht nötig.

Vermutlich wird der Mittelweg zwischen den beiden Alternativen zutreffen, wobei der Zustand der Algen dafür ausschlaggebend ist, inwieweit eine Verdrängung der Leeratmung stattfindet. Einen befriedigenden Einblick in diese Frage werden vermutlich nur Versuche mit markierter Glucose geben können.

Wie die Tab. 2 zeigt, werden insgesamt etwa 100 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> verbraucht bzw. 120 mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> gebildet, wenn 1 mg Glucose verschwindet. Da 1 mg Glucose bei vollständiger Veratmung rund 750 mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> liefert, errechnet sich ein synthetischer Wirkungsgrad (vgl. Kandler<sup>22</sup>) von etwa 5,0, d. h. für 1 Mol veratmeter Glucose werden 5 Mol assimiliert. Dieses Verhältnis ist ziemlich unabhängig davon, ob der Einbau bei völliger Sättigung des Atmungssystems, die nur bei der Probe mit der größten Glucosemenge erreicht wird, oder noch während des Atmungsanstieges erfolgt. Vollkommene Übereinstimmung der Werte der 3 Proben wird nach Korrektur durch die Leeratmung erzielt. Die tatsächlich gefundenen Zunahmen an Trockengewicht stimmen mit den theoretisch errechneten gut überein, wenn man die oben erwähnten Gewichtsverluste durch Wasseraustritt und Hydrierung berücksichtigt. Wir dürfen also annehmen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen eine intensive oxydative Assimilation von Glucose zu Polysacchariden und in geringem Umfange auch zu stärker hydrierten Substanzen, vermutlich Fett, erfolgt.

Führt man nun ganz analoge Versuche in der Weise aus, daß jeweils von 2 gleichartig beschickten Gefäßen eines verdunkelt und eines belichtet wird, so kann die Wirkung des Lichtes auf den Glucoseeinbau leicht untersucht werden. Da zunächst nur eine Warburg-Apparatur ohne spezielle Belichtungseinrichtung vorhanden war, konnten nur wenige Gefäße gleichzeitig belichtet werden, und die Belichtung von oben her lieferte auch nur geringe Beleuchtungsstärken, die günstigenfalls gerade zur Kompensation der Glucoseatmung ausreichten. Dies war zunächst auch genügend, denn um den Endpunkt der Glucoseatmung zu bestimmen, wurde nur so stark belichtet, daß der Kompensationspunkt nicht ganz erreicht wurde. Beim Aufhören der Glucoseatmung konnte dann die stark abfallende Atmung sofort kompensiert werden, und es entstanden sogar schwache Überdrucke. Die Überdrucke erklären sich trotz der Anwesenheit von KOH im Gefäß daraus, daß der RQ bei der Glucoseatmung über 1,0 ist, die

<sup>22</sup> O. Kandler, Z. Naturforschg. **8b**, 110 [1953].

Photosynthese aber mit einem Quotienten von annähernd 1,0 verläuft. So kann mehr O<sub>2</sub> entstehen als durch die Atmung verbraucht wird. Dieser Effekt kommt allerdings nicht voll zur Auswirkung, da die KOH mit der Photosynthese um das CO<sub>2</sub> konkurriert. Die Bedingungen für den CO<sub>2</sub>-Einbau waren in all diesen Versuchen keineswegs optimal, da nur das Atmungs-CO<sub>2</sub> zur Verfügung stand. Gerade unter diesen Bedingungen aber war zu hoffen, daß die nicht für den CO<sub>2</sub>-Einbau verwendbare Lichtenergie für andere Synthesen benützt würde.

Wurden derartige Versuche mit frisch geernteten oder nur wenige Stdn. verarmten Algen ausgeführt, so ergaben sich die gleichen Verhältnisse wie sie Myers<sup>7</sup> beschrieb. Sowohl im Dunkeln wie im Licht erfolgte der Atmungsabfall gleichzeitig. Wurden größere Glucosemengen verwendet, so daß die Glucoseatmung einige Stdn. andauerte, dann trat im Licht eine Verspätung des Abfalls ein, d. h. der Glucoseeinbau wurde durch die Resynthese des Großteiles der veratmeten Glucose im Licht gehemmt. Diese Verzögerung konnte bis zu 20% der Gesamtversuchszeit betragen.

Benützt man jedoch mindestens 24 Stdn. verarmte Algen zu diesen Versuchen, so ergeben sich die in Abb. 4 dargestellten Verhältnisse. In diesem Versuch wurde die Glucose allerdings nicht nach Beginn der Atmungsmessung zugekippt, weil dabei immer gewisse Fehler entstehen können, sondern die Glucose wurde vor dem Einpipettieren in die Atmungsgefäße gemeinsam zugegeben. Damit erhalten die Parallelgefäße absolut gleiche Mengen. Die 2 mg Glucose enthaltenden Proben zeigen schon 25 min nach Beginn der Messungen einen im Licht und im Dunkeln gleichzeitigen Abfall. Die Ableseperioden von 5 min lassen feinere Unterschiede als 5 min auch nicht erkennen. Bei 4 mg Glucose pro Probe ergibt sich jedoch eine Differenz zwischen Licht und Dunkelheit von 15 min und bei 6 mg eine solche von 20 min. Diese Differenzen sind weit außerhalb der Fehlergrenzen und in Dutzenden von ähnlichen Versuchen konnte die gleiche Erscheinung beobachtet werden. Ersetzt man die KOH durch Pardee-Puffer, der in der früher (Kandler<sup>1</sup>) beschriebenen Weise angewendet wurde, so ergibt sich auch hier die gleiche Differenz, wie Abb. 5 zeigt.

Steigert man die Glucosemengen immer weiter, so vergrößert sich die Differenz zwischen Licht- und Dunkelabfall nicht entsprechend, sondern nimmt bei lang anhaltender Glucoseatmung wieder ab. Bei Versuchszeiten über 6 Stdn. tritt dann der Abfall im

Licht sogar später ein als im Dunkeln. Dies läßt sich zwanglos durch die Annahme erklären, daß nur bei gut verarmten Algen, bei denen keinerlei Kohlenhydratreserven vorhanden sind, die Durchsatzgeschwindigkeit der Fermente so groß ist, daß die

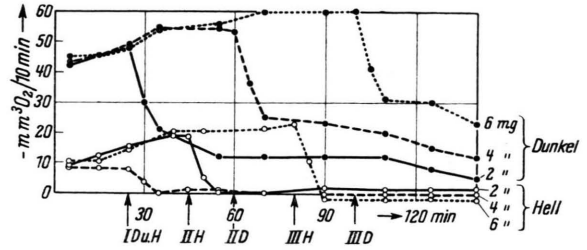


Abb. 4. Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme bei Zusatz verschiedener Glucosemengen. 3 Proben schwach belichtet. Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Glucoseverbrauchs der I., II. bzw. III. Hell- oder Dunkelprobe an.

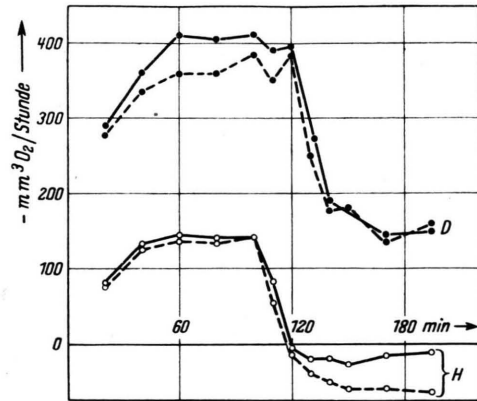


Abb. 5. Geschwindigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauchs bei Zusatz von Glucose. — KOH, --- Pardee-puffer im Einsatz.

ATP den Minimumfaktor darstellt und eine Zusatzlieferung von ATP aus der Photosynthese eine Beschleunigung des Glucoseeinbaues bewirken kann. Staut sich jedoch allmählich das Assimilationsprodukt an, so bremst es nach dem Massenwirkungsgesetz die weitere Synthese ab und die ATP-Versorgung hat keinen Einfluß mehr auf die Einbaugeschwindigkeit. Es kommt nunmehr sogar zur Konkurrenz zwischen dem Glucosephosphat aus der oxydativen Assimilation und dem aus der Photosynthese. Offensichtlich liegt hier ein Effekt vor, wie er auf Grund der eingangs skizzierten Überlegungen gesucht wurde, und in den folgenden Versuchen werden weitere Beweise für die Richtigkeit der eben gegebenen Deutung beigebracht.



## 2. Abhängigkeit des Glucose-Einbaues im Dunkeln und im Licht von verschiedenen Versuchsbedingungen und dem Zustand der Algen

Bei allen bisherigen Versuchen war bis zum völligen Verbrauch der Glucose gewartet worden, und es war nicht sicher, ob nicht gegen Versuchsende die Verminderung der Glucosekonz. die Einbaurrate verschlechtert und somit den Licht-Dunkel-Unterschied nicht im vollen Umfang liefert. In Zukunft wurde daher so verfahren, daß zur Ausgangssuspension eine größere Glucosemenge gegeben und dann die Proben in die Atmungströge verteilt wurden, wie bereits oben eingehender dargestellt wurde. Normalerweise

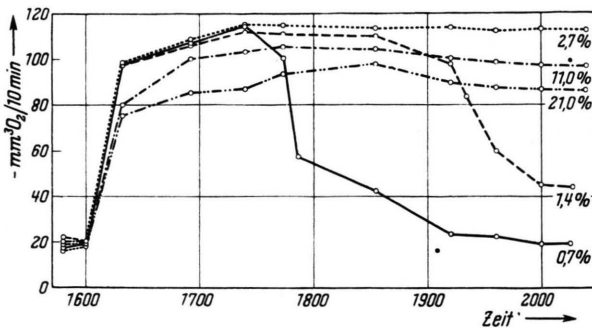


Abb. 6. O<sub>2</sub>-Aufnahme von Chlorellen bei verschiedener Glucosekonzentration.

waren in 1 ccm 5–10 mg Glucose enthalten, von denen während der Versuchszeit etwa die Hälfte aufgenommen wurde. Während der Versuchszeit trat also kein Mangel an Glucose ein.

### a) Einfluß der Puffer- und Zuckerkonzentration sowie der Suspensionsdichte auf den Glucoseeinbau

Ein optimaler Lichteinbau von Glucose konnte nur erwartet werden, wenn die übrigen Bedingungen für den Glucoseeinbau ganz allgemein optimal waren. Da für *Chlorella* noch keine eingehenden Versuche über die Abhängigkeit der oxydativen Assimilation von Außenbedingungen vorliegen, sollen einige grundsätzliche Vorversuche mitgeteilt werden.

Zunächst wurden verschieden molare Phosphatpuffer untereinander und gegenüber dest. Wasser verglichen. Geprüft wurde nur O<sub>2</sub>-Aufnahme und Glucoseverbrauch im Verlauf von 3 Std. Ein repräsentativer Versuch ist in Tab. 3 zusammengestellt. Dabei wurde ein Versuch mit frisch geernteten Algen

	m/15	m/45	m/90	Aqua dest.
Glucoseatmung Q <sub>O<sub>2</sub></sub> . . .	15,4	17,8	18,6	18,6
Δ Glucose . . . . .	6,7	7,0	7,0	7,0
Leeratmung Q <sub>O<sub>2</sub></sub> . . . . .	6,9	9,0	9,2	9,3
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt)	159	167	177	180
O <sub>2</sub> /mg Glucose (korrig.)	97	95	99	100

Tab. 3. Atmung und Glucoseverbrauch in Abhängigkeit von der Molarität des Phosphatpuffers. Unverarmte Algen, p<sub>H</sub> 6,5. Alle Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg.

ausgewählt, um die relativ geringe Atmungssteigerung dieses Materials gegenüber verarmtem, wie es in den übrigen Versuchen verwendet wurde, auch zahlenmäßig zu demonstrieren. Die höchsten Q<sub>O<sub>2</sub></sub> werden im dest. Wasser und in sehr schwachen Pufferlösungen erreicht. m/15-Phosphatpuffer hemmt deutlich, während m/45 keine regelmäßig auftretende Hemmung verursacht. m/45 wurde auch zu den späteren Versuchen allgemein verwendet, da die Pufferkapazität noch schwächerer Puffer zu gering gewesen wäre. Schon der m/45-Puffer wurde bei den extremen p<sub>H</sub>-Stufen in Richtung auf 6,3, den p<sub>H</sub>-Wert der sich in dest. Wasser einstellt, verschoben. Der Quotient O<sub>2</sub>/mg Glucose liefert wiederum nach Korrektur mit der Leeratmung die konstanteren Werte.

Wichtig war zu wissen, welchen Einfluß verschiedene Glucosekonzentrationen ausüben. Für Hefen konnten Schachinger und Heiss<sup>23</sup> zeigen, daß erst bei Konzentrationen über 10% Glucose eine Hemmung der Gärung auftritt. Ähnlich ist es auch bei *Chlorella*, wie Abb. 6 zeigt. Bei 11% wird die maximale Atmungsgeschwindigkeit nicht mehr ganz erreicht, und nach einiger Zeit sinkt sie allmählich ab. 21% hemmen noch deutlicher. Die verwendeten Konzentrationen lagen im allgemeinen zwischen 0,5 und 1,0%; ein Bereich, in dem offensichtlich keine Abhängigkeit der Atmungsintensität von der Glucosekonzentration besteht.

In einem weiteren Vorversuch war zu klären, ob eventuell die sehr hohe und bei den verschiedenen Versuchsserien unterschiedliche Algenkonzentration einen Einfluß auf den Atmungsstoffwechsel haben könnte. Gewöhnlich befanden sich bei den Versuchsansätzen 4 mg bis 10 mg Algen (Trockengewicht) in 1 ccm, d. h. 12–30 mg in einem Atmungsgefäß. Tab. 4 gibt die Daten für Proben gleicher Suspension, die jeweils um die Hälfte verdünnt worden

<sup>23</sup> L. Schachinger u. R. Heiss, Arch. Mikrobiol. 16, 367 [1951].

mg/3 ccm Trockengewicht	31,0	15,5	7,75
— O <sub>2</sub> . . . . .	1450	750	309
Max QO <sub>2</sub> . . . . .	18,6	18,4	18,7
Δ Glucose (Dunkel) . . . . .	13,6	7,0	3,5
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt) . . . . .	106,5	107	105,5

Tab. 4. Atmung und Glucoseeinbau bei verschiedener Algenkonzentration. 48 Stdn. verarmte Algen, m/45-Phosphatpuffer, p<sub>H</sub> 5,6. Alle Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg.

waren. Im Gasraum der Atmungsgefäße befand sich O<sub>2</sub> wie bei allen Versuchen, da bei dem starken Stoffwechsel der Vorrat an O<sub>2</sub> im Laufe der Versuchszeit erschöpft und der O<sub>2</sub>-Partialdruck zu weit absinken würde. Bei kräftigem Schütteln war zwischen O<sub>2</sub> und Luft als Gasphase kein Unterschied in der O<sub>2</sub>-Aufnahme. Die Tab. 4 zeigt, daß weder im maximalen QO<sub>2</sub> noch im Quotienten O<sub>2</sub>/mg Glucose eine Abhängigkeit von der Algenkonzentration besteht. Es bestehen also keine Bedenken, für derartige Versuche Suspensionen solcher Dichte zu verwenden.

b) Einfluß von Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration und CO<sub>2</sub>-Versorgung auf den Glucoseeinbau in Licht und Dunkelheit

Alle bisherigen Versuche waren bei 27°C ausgeführt worden, ohne daß geprüft worden wäre, ob diese Temperatur für den Glucoseeinbau besonders günstig ist. Es wurden daher 3 Versuchsserien ausgeführt, bei denen jeweils an einem Tage mit Material einer Ernte hintereinander bei 3 verschiedenen Temperaturen die Glucoseaufnahme untersucht wurde. Ein typischer Versuch ist in Tab. 5 dargestellt.

stellt. Verwendet wurden dabei 2 Tage verarmte Algen in m/45-Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 5,6. Je 4 Gefäße wurden belichtet bzw. verdunkelt, und davon enthielten je 2 KOH, während 2 Gefäße ohne KOH blieben, so daß auch der RQ bestimmt werden konnte. Die Glucoseanalysen wurden nur in den Gefäßen mit KOH ausgeführt, worauf später noch eingegangen wird. Die angeführten Werte sind die Mittelwerte aus den beiden Parallelproben. Die Belichtung war so stark, daß die Atmung überkompensiert war. Die Ausführlichkeit der Tabelle erübrigt eine eingehende Besprechung. Hingewiesen sei nur auf das unterschiedliche Verhalten der Leer- und Glucoseatmung. Erstere steigt im 1. Intervall nur schwach, im 2. Intervall aber stark an, während sich die Glucoseatmung gerade umgekehrt verhält. Die Glucoseabnahme ist bei 27°C und 37°C gleich stark, bei 17°C erheblich verringert. Die gesteigerte Glucoseaufnahme im Licht beträgt sowohl bei 27°C als auch bei 37°C etwa 24%, während sie bei 17°C, wo auch der synthetische Wirkungsgrad deutlich vermindert ist, praktisch ausbleibt. Diese verminderte Ausnützung bei niedrigerer Temperatur widerspricht den Erfahrungen bei anderem Pflanzenmaterial und betrifft wahrscheinlich nicht das Gesamtwachstum, das bei *Chlorella*-Kulturen gerade bei diesen Temperaturen sehr gut ist, sondern nur den einseitigen Glucoseeinbau unter diesen speziellen Versuchsbedingungen. Als optimal erwies sich bei verschiedenen Stufungen ein Bereich zwischen 23°C und 30°C, so daß auch weiterhin die Temperatur von 27°C beibehalten wurde.

Von besonderer Wichtigkeit war die Kenntnis über den Einfluß der H-Ionenkonzentration der Suspensionslösung auf den Glucoseeinbau und besonders

	17° C		27° C		37° C	
	+ Glucose	leer	+ Glucose	leer	+ Glucose	leer
— O <sub>2</sub> . . . . .	615	1,23	840	119	970	171
CO <sub>2</sub> . . . . .	728	92	998	107	1130	177
RQ . . . . .	1,18	0,74	1,185	0,9	1,16	1,03
Max QO <sub>2</sub> . . . . .	12,0	2,0	16,5	2,3	18,0	3,16
Δ Glucose (Dunkel) . . . . .	4,0	—	6,6	—	6,7	—
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt) . . . . .	154	—	126	—	145	—
O <sub>2</sub> /mg Glucose (korrigiert) . . . . .	123	—	109	—	119	—
CO <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt) . . . . .	181	—	151	—	169	—
O <sub>2</sub> /mg Glucose (korrigiert) . . . . .	159	—	135	—	142	—
S. W. (gesamt) . . . . .	3,12	—	3,95	—	3,45	—
S. W. (korrigiert) . . . . .	3,7	—	4,5	—	4,27	—
Δ Glucose (Licht) . . . . .	4,1	—	8,2	—	8,3	—

Tab. 5. Glucoseumsatz bei verschiedener Temperatur. Alle Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg. Näheres im Text.

$p_H$	4,8—5,0	6,5—6,3	7,15—6,9	8,2—7,8	9,7—8,3	10,5—9,5
Max $Q_{O_2}$ . . . . .	17,8	17,1	17,1	16,7	9,6	5,9
Leer $Q_{O_2}$ . . . . .	3,9	—	4,1	—	4,0	—
Glucoseatmung $RQ$ . . . . .	1,25	—	1,27	—	1,05	—
Leeratmung $RQ$ . . . . .	0,8	—	0,8	—	0,85	—
$\Delta$ Glucose (Dunkel) . . . . .	7,3	7,3	7,0	6,7	2,2	0,9
$\Delta$ Glucose (Licht) . . . . .	7,6	8,1	8,0	6,5	1,8	0,7
$O_2$ /mg Glucose (gesamt) . . . . .	114	108	111	120	157	289
$O_2$ /mg Glucose (korrigiert) . . . . .	95	—	91	—	93	—
Veratmete Glucose (gesamt) . . . . .	1,39	—	1,32	—	0,49	—
Veratmete Glucose (korrigiert) . . . . .	1,24	—	1,17	—	0,34	—
S. W. (gesamt) . . . . .	1 : 4,25	—	1 : 4,3	—	1 : 3,5	—
S. W. (korrigiert) . . . . .	1 : 4,9	—	1 : 5,0	—	1 : 5,5	—

Tab. 6. Glucoseumsatz bei verschiedenen  $p_H$ -Stufen. 48 Stdn. verarmte Algen,  $m/45$ -Phosphatpuffer. Alle Angaben in  $mm^3$  bzw. in  $mg$ .

auf den Lichteffect. Taylor<sup>8</sup> hatte bei *Scenedesmus* eine Verschlechterung der Einbauraten mit zunehmender Alkalität beobachtet. In den  $p_H$ -Stufungsversuchen mit *Chlorella*, in Tab. 6 sind die Daten für einen typischen Fall angegeben, ergab sich insofern eine Abweichung, als zwischen  $p_H$  5,2 und 7,5 praktisch kein Unterschied in der Gesamtaufnahme und im synthetischen Wirkungsgrad auftritt. Im Alkalischen setzt jedoch eine Hemmung der Gesamtaufnahme ein, die bei hohen  $p_H$ -Werten 90% erreicht. Gleichzeitig sinkt auch die Glucoseatmung, während die Leeratmung gleich bleibt. Bezogen auf den Gesamtverbrauch an  $O_2$  ergibt sich dadurch eine Verschlechterung des synthetischen Wirkungsgrades, die aber durch Berücksichtigung der Leeratmung wieder beseitigt wird. Bei noch extremen  $p_H$ -Werten ist diese Korrektur sicherlich nicht mehr möglich. Die Glucoseaufnahme ist dann aber schon so gering, daß sie nicht mehr genau genug bestimmt werden kann, um sinnvolle Berechnungen anzustellen. Gerade an diesem Beispiel werden die Zweifel an der Berechtigung der Korrektur durch Abzug der vollen Leeratmung besonders stark, denn es ist schwer einzusehen, daß bei einer so deutlichen Hemmung des Gesamtumsatzes wie bei  $p_H$  9,7—8,3 eine Verbesserung des synthetischen Wirkungsgrades zustandekommen kann. Ohne eingehendere Versuche mit markierter Glucose erscheinen mir aber Erörterungen dieser Fragen sinnlos.

In den einzelnen Spalten der Tab. 6 sind  $p_H$ -Intervalle angegeben, weil der  $m/45$ -Puffer nicht zu einer vollen Stabilisierung ausreichte. Die erste Zahl bedeutet jeweils den Anfangswert, die 2. Zahl den Endwert.

Die Glucoseabnahme in den belichteten Proben war im sauren Bereich in allen Fällen stärker als

bei den Dunkelproben, wobei die Differenz im untersten Bereich erheblich geringer war. Genauere Stufungen zeigten, daß  $p_H$  5,0 etwa die Grenze darstellt unterhalb der der gesteigerte Lichteinbau vermindert wird. Bei  $p_H$  5,3 ist er jedoch gleich wie bei den weiteren  $p_H$ -Werten bis etwa 7,5. Parallel zur starken Glucoseeinbau-Hemmung im Alkalischen bei den Dunkelproben fehlt auch die Förderung durch Belichtung; sie wird im Gegenteil sogar durch eine Hemmung ersetzt. Diese starke  $p_H$ -Abhängigkeit des Glucoseeinbaues im allgemeinen und der Steigerung durch Belichtung im besonderen ist leicht verständlich, da die beteiligten Fermente ebenfalls stark  $p_H$ -abhängig sind. So nimmt z. B. die Aktivität der Phosphorylase (vgl. Paech<sup>24</sup>) mit ansteigendem  $p_H$  ab, weshalb im alkalischen Bereich keine Steigerung des Einbaues durch Licht zu erwarten war.

Auf Grund dieser Versuche kann nunmehr gesagt werden, daß die gesteigerte Glucoseassimilation im Licht mit Sicherheit gemessen werden kann, wenn man mindestens 24 Stdn. verarmte Algen in dest. Wasser oder  $m/45$ -Phosphatpuffer  $p_H$  5,2—7,5 suspendiert und bei 27°C einer Belichtung aussetzt, durch die die Atmung kompensiert wird. Der bereits in Tab. 1 dargestellte Versuch mit 6 Parallelproben erfüllt alle diese Bedingungen und zeigt, daß die vermehrte Abnahme der Glucose im Licht weit außerhalb der Fehlergrenze liegt. Die absolute Höhe der Förderung ist bei Parallelproben gleichen Materials weitgehend gleich, bei Material verschiedener Ernte jedoch größeren Schwankungen unterworfen. Dies gilt auch für den Quotienten  $O_2$ /mg Glucose. Derartige Schwankungen lassen sich aber beim Arbeiten mit Organismen wohl schwerlich ganz vermeiden.

<sup>24</sup> K. Paech, Fortschr. Bot. 12, 287 [1949].



Als nächster Faktor wurde die Lichtintensität variiert, um deren Einfluß klarzustellen. Mit Hilfe von Absorptionsgittern konnte eine Lichtstufung hergestellt werden, wobei das am schwächsten beleuchtete Gefäß bei 100% Absorption 0,45  $\mu\text{Mol}$  Quanten/min, das am stärksten beleuchtete Gefäß dagegen 3,0  $\mu\text{Mol}$  Quanten/min erhielt. Die Absorption des Lichtes durch die sehr dichten Suspensionen dürfte über 90% betragen haben, doch war eine genaue Bestimmung nicht möglich, da die von Warburg entwickelten Aktinometergefäße nicht verfügbar waren.

Wie Abb. 7 zeigt, bewirkt bereits 1,0  $\mu\text{Mol}$  Quanten/min beinahe maximale Steigerung der Glucoseaufnahme durch Belichtung, und stärkere Belichtung

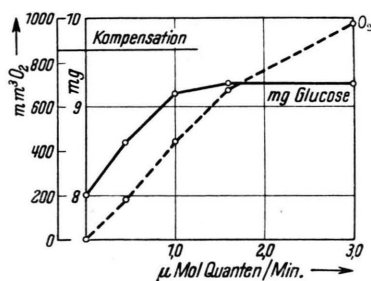


Abb. 7. Glucoseverbrauch und  $\text{O}_2$ -Bildung in Abhängigkeit von der Belichtung. 2 Tage verarmte Algen, m/45-Phosphatpuffer  $p_{\text{H}}$  5,6. Versuchsdauer 3 h.

bleibt wirkungslos. Die Atmung ist bei dieser Belichtung nur zur Hälfte kompensiert und bei stärkerer Belichtung steigt die  $\text{O}_2$ -Entwicklung weiterhin linear an. Die Überschreitung des Kompensationspunktes, obwohl KOH im Einsatz und damit der Gasraum  $\text{CO}_2$ -frei war, konnte in diesem Ausmaß nur beobachtet werden, wenn gleichzeitig Glucose geboten wurde. Ohne Glucose traten nur sehr geringe positive Drucke auf, wie bereits früher erwähnt. Vermutlich ist dies nicht nur auf den erhöhten RQ zurückzuführen, sondern z. T. auch darauf, daß Zwischenprodukte des Glucoseabbaus durch den photosynthetisch erzeugten H hydriert werden können und somit an Stelle von  $\text{CO}_2$  als H-Acceptoren (Hill-Reagens!) fungieren.

Die Tatsache, daß schon geringe Lichtmengen genügen, um den maximalen Effekt beim Glucoseeinbau zu erzielen, erleichterte die weiteren Versuche erheblich. Dadurch konnten die dichten Suspensionen, die notwendig sind, um in kurzer Zeit sicher bestimmbare Glucosemengen umzusetzen, ohne Schwierigkeit hinreichend ausgeleuchtet werden. Es war auf Grund unserer Arbeitshypothese

auch ein sehr befriedigendes Ergebnis, denn es ist leicht verständlich, daß ein geringer Zusatz von ATP genügt, um wieder andere, am Glucoseeinbau beteiligte Faktoren ins Minimum treten zu lassen, was ohne den Kunstgriff der Verarmung ohnehin der Fall ist. Weitere Energielieferung aus der Photosynthese muß dann wirkungslos bleiben. Dagegen spricht das Ergebnis gegen die Annahme, daß evtl. eine mit der  $\text{CO}_2$ -Assimilation einhergehende Atmungssteigerung zu verstärkter oxydativer Assimilation der Glucose führen könnte. In diesem Falle wäre nicht verständlich, warum die Kurven nur in ihrem untersten Abschnitt parallel verlaufen. Weiterhin müßte dann durch Verbesserung der Assimilationsbedingungen, z. B. Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Spannung, eine Verstärkung des Lichteffects erreicht werden.

Bei der RQ-Bestimmung mit Hilfe der 2-Gefäßmethode war immer wieder aufgefallen, daß die Glucoseabnahme in dem Gefäß ohne KOH, also mit dem Atmungs- $\text{CO}_2$  im Gasraum, geringer war als in dem Gefäß mit KOH. Die Differenz betrug allerdings nur knapp 10% und war bei vielen Versuchen noch kleiner. Da bei beiden Gefäßen nur die Gasphase unterschiedlich war, konnte nur die  $\text{CO}_2$ -Ansammlung die Ursache der Einbauhemmung sein, und der Effekt mußte sich verstärken, wenn gleich zu Versuchsbeginn eine größere  $\text{CO}_2$ -Menge gegeben wurde. In einigen Versuchsreihen wurde daher jeweils eines von 3 gleichartigen Gefäßen nicht mit  $\text{O}_2$ , sondern mit Carbogen (5%  $\text{CO}_2$  + 95%  $\text{O}_2$ ) gefüllt. In Tab. 7 sind einige derartige Versuche zusammengestellt. Nur die Versuche am gleichen Tage sind mit gleicher Suspension ausgeführt und stellen Parallelproben dar, während in den Versuchen der verschiedenen Tage unterschiedliche Algenmengen verwendet wurden, so daß eine statistische Verwertung der Zahlen nicht ohne weiteres möglich ist. Die Unterschiede sind aber so deutlich und in allen Versuchen völlig gleichgerichtet, daß wohl kein Zweifel an der Richtigkeit des Ergebnisses besteht. Im Dunkeln ist die Glucoseaufnahme durch den Zusatz von Carbogen erwartungsgemäß noch stärker gehemmt als in dem Gefäß ohne KOH. Im Licht verursacht die Gegenwart des Atmungs- $\text{CO}_2$  keine oder jedenfalls nur sehr minimale Hemmung, da es durch die Photosynthese ja wieder verbraucht wird, während bei Carbogen wiederum eine deutliche Hemmung auftritt. Obwohl der  $\text{CO}_2$ -Einbau unter Carbogen zweifellos besser war als in dem Gefäß mit KOH (die Belichtung war so stark, daß erheblich überkompensiert war), ist die Glucoseaufnahme nur gleich

	+ KOH		- KOH		+ Carbogen	
	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht
21. 12. 53	14,4	16,5	12,9	16,5	11,3	15,0
21. 12. 53	14,4	16,0	12,9	15,5	12,3	14,0
17. 12. 53	9,7	11,6	9,4	11,6	8,4	11,2
17. 12. 53	9,7	12,1	9,2	11,6	8,5	10,7
5. 3. 54	10,15	11,0	9,0	10,3	8,0	9,0
5. 3. 54	10,10	11,0	9,0	10,2	8,0	9,0
26. 4. 54	11,2	12,2	10,3	12,1	9,3	10,1
Mittelwerte	11,3	12,9	10,35	12,5	9,25	11,3

Tab. 7. Glucoseverbrauch in 3 Std. bei verschiedener Gasphase. Algenkonzentration innerhalb der Versuche mit gleichem Datum gleich, aber an verschiedenen Tagen unterschiedlich. 24 bis 48 Std. verarmte Algen in Phosphatpuffer. Angaben in mg.

stark wie im Dunkeln mit KOH und geringer als im Licht mit KOH. Der gesteigerte Glucoseeinbau im Licht geht also zweifellos nicht der  $\text{CO}_2$ -Assimilation parallel, sondern wird von dieser eher gehemmt, da, unserer Hypothese folgend, die Lichtenergie zur  $\text{CO}_2$ -Assimilation verbraucht und daher nicht mehr zum Glucoseeinbau verwendet werden kann.

Die Beobachtung, daß schon der Anstieg des Atmungs- $\text{CO}_2$  zu einem verminderten Glucoseeinbau führt, stellt die Exaktheit der  $RQ$ -Bestimmung mit Hilfe der 2-Gefäßmethode in Frage. Es ist dabei vorausgesetzt, daß in beiden Gefäßen der gleiche Stoffwechsel abläuft, was offensichtlich nicht ganz der Fall ist. Daher wurden die  $RQ$ -Bestimmungen auch mit Hilfe der Dixon-Gefäße durchgeführt, wobei in einem Gefäß zuerst ohne KOH die Druckunterschiede gemessen werden und dann erst durch eine Hahndrehung KOH mit dem Gasraum in Kommunikation gebracht wird, so daß der Druckabfall durch Absorption des  $\text{CO}_2$  direkt den  $\text{CO}_2$ -Gehalt angibt. Auf diese Weise wurden  $RQ$ -Werte erhalten, die etwa um 0,05 Einheiten über den mit der 2-Gefäßmethode bestimmten lagen.

Für die Verschlechterung der Glucoseaufnahme bei  $\text{CO}_2$ -Gegenwart sind grundsätzlich 2 Erklärungsmöglichkeiten gegeben: 1. kann die  $\text{CO}_2$ -Stauung eine Atmungshemmung und damit auch eine Hemmung der oxydativen Assimilation bewirken und 2. kann der Dunkeleinbau von  $\text{CO}_2$ , der bisher immer nur ohne gleichzeitige Kohlenhydratfütterung bestimmt wurde, durch die reichliche Energieversorgung beim Glucoseabbau erheblich gesteigert sein,

was dann allerdings in der Summenbetrachtung des Gaswechsels ebenfalls als Atmungshemmung in Erscheinung treten würde. Grundsätzlich ist dieser Vorgang aber von einer bloßen Atmungshemmung streng zu trennen. Die Verminderung des Glucoseeinbaues würde nämlich dann nicht auf einem verminderten Angebot an ATP beruhen, sondern wegen der Abzweigung der entstehenden ATP für den  $\text{CO}_2$ -Einbau verursacht sein. Doch lassen sich derartige Überlegungen nur mit Tracer-Methoden experimentell fundieren.

Mit den mir zur Verfügung stehenden Methoden konnte nur sicher bewiesen werden, daß unter Carbogen tatsächlich erheblich weniger  $\text{CO}_2$  in den Gasraum abgegeben wird, als unter  $\text{O}_2$  bei gleichzeitiger Absorption des  $\text{CO}_2$  durch KOH. Dazu diente folgender Versuch. Algen wurden 24 Std. vorgefüttert, erneut gewaschen und in dest. Wasser suspendiert. Die Suspension erhielt einen Zusatz von Glucose, so daß in den 3 ccm, die in jedes von 6 Atmungsgefäßen pipettiert wurden, neben 32 mg Algen (Trockengewicht) auch 19 mg Glucosehydrat vorhanden waren. 3 Gefäße wurden mit  $\text{O}_2$ , 3 mit Carbogen gefüllt und im Laufe der nächsten 12 Std. an den ersteren die  $\text{O}_2$ -Aufnahme bestimmt. Mit 2 Dixongefäßen wurden an Proben der gleichen Suspension die  $RQ$ -Bestimmung durchgeführt, um von dem gemessenen  $\text{O}_2$ -Verbrauch auf  $\text{CO}_2$  umrechnen zu können. Nach etwa 9 Std. zeigte der Atmungsabfall in den Gefäßen mit KOH den endgültigen Verbrauch der Glucose an. In den Gefäßen mit Carbogen konnte dieser Zeitpunkt, der analog früheren Versuchen

später liegen mußte, nicht genau bestimmt werden, doch war nach 12 Stdn. ebenfalls die gesamte Glucose aus der Lösung verschwunden. Je 2 ccm wurden aus den Atmungsgefäßen nach 12 Stdn. entnommen und in Wägeggläsern gegeben, um das Trockengewicht zu bestimmen.

Da Glucosehydrat geboten wurde, muß bei der Aufstellung der Bilanz zunächst von der Gesamtmenge 9,1% für Hydratwasser abgezogen werden; von der „eingebauten Glucose“ kommen dann noch weitere 10% in Abzug wegen des Kondensationswassers. In den Gefäßen mit KOH wurden im Mittel 4600 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> verbraucht bzw. 6200 CO<sub>2</sub> gebildet. Das entspricht einem Gewichtsverlust von 8,2 mg. Dazu kommen 1,72 mg Hydratwasser und 0,9 mg Kondensationswasser aus den 9,0 mg eingebauter Glucose. Das ergibt eine Trockengewichtsabnahme gegenüber den anfänglichen 32 + 19 = 51 mg von 11,02 mg. Tatsächlich gefunden wurde eine Differenz von 11,5 mg, was mit der Erwartung gut übereinstimmt, wenn man bedenkt, daß durch Hydrierung eines Teiles der assimilierten Glucose weiterer Gewichtsverlust verbunden ist. Wenn unter Carbogen die gleiche Menge an CO<sub>2</sub> entwickelt wurde, mußte die gleiche Gewichtsabnahme auftreten. In Wirklichkeit aber betrug der Trockengewichtsschwund bei diesen 3 Gefäßen nur 8,0 mg, also beinahe 25% weniger. Es ist also in diesem Falle erheblich weniger CO<sub>2</sub> abgegeben worden, obwohl die gleiche Menge Glucose verbraucht wurde wie unter O<sub>2</sub>, allerdings in einem vermutlich längeren Zeitraum. Ob man diesen Effekt tatsächlich einer verstärkten Dunkelassimilation von CO<sub>2</sub> zuschreiben darf, kann nach diesen Versuchen allerdings nicht entschieden werden, doch erscheint es mir wahrscheinlich.

Zu diesem Versuch waren vorgefütterte „Kohlenhydrat-Stau-Zellen“ benützt worden, weil bei diesen der synthetische Wirkungsgrad sehr niedrig ist, worauf später noch eingehender hingewiesen werden wird. Trotzdem ist die Atmung sehr hoch, so daß sehr gut wägbare Gewichtsverluste eintreten.

Um zu sehen, ob die Hemmung des Glucoseeinbaues mit der Versuchsdauer zu- oder abnimmt, wurde eine Zeitstufung unter O<sub>2</sub> und Carbogen ausgeführt, wobei Parallelgefäße in etwa 45 min Abstand nacheinander auf ihren Glucoseverbrauch untersucht wurden. Das Ergebnis zeigt Abb. 8. Alle Kurven steigen linear an, wobei jeweils die Kurven für O<sub>2</sub> L und Carbogen L, bzw. O<sub>2</sub> D und Carb. D stetig auseinanderstreben. Die Hemmung ist also zeitlich konstant. Im Gegensatz dazu vergrößert sich

der Abstand der Kurven für O<sub>2</sub> D und O<sub>2</sub> L, bzw. Carbogen D und Carbogen L nicht gleichmäßig, worauf im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

### c) Abhängigkeit des Glucoseeinbaues im Licht von der Zeit und der Vorbehandlung der Algen

Bereits bei der manometrischen Bestimmung des Glucoseeinbaues wurde beobachtet, daß die Differenz zwischen den Licht- und Dunkelproben mit verlängerter Versuchsdauer nicht konstant zunahm, sondern nach mehreren Stunden Glucoseumsatz sogar geringer wurde. Wenn man Parallelproben nach ver-

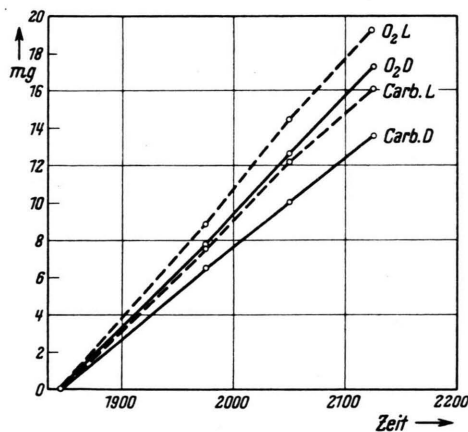


Abb. 8. Glucoseverbrauch bei verschiedener Gasphase in Licht und Dunkelheit in Abhängigkeit von der Zeit.

schiedenen Zeiten auf ihren Glucoseverbrauch hin analysiert, ergeben sich für Licht bzw. Dunkelheit die in der Abb. 9 dargestellten Verhältnisse. Nur in den ersten 2—3 Stdn. ist bei verarmten Algen der Glucoseverbrauch im Licht gesteigert, dann wird er dem im Dunkeln gleich und bleibt schließlich hinter diesem zurück. Der Glucoseverbrauch im Dunkeln verläuft längere Zeit linear, wird aber nach mehreren Stdn. ebenfalls geringer. Dagegen bleibt der O<sub>2</sub>-Verbrauch nach dem Anstieg in den ersten 1½ Stdn. praktisch konstant, so daß sich allmählich eine Erhöhung des Quotienten O<sub>2</sub>/mg Glucose ergibt. Bei Bezug auf das jeweilige Trockengewicht, das auf Grund des Glucoseeinbaues stark ansteigt, würde die Atmungsintensität natürlich abfallen.

Die Erhöhung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs pro mg aufgenommener Glucose auch im Dunkeln zeigt an, daß das aufgestaute Assimilationsprodukt auf die Synthese bremsend wirkt, und es ist daher sehr verständlich, daß auch die anfängliche Steigerung durch Belichtung



Stunden		2	4	6	8	
Dunkel	$\Delta$ Glucose (gesamt) . . . . .	5,3	10,8	16,3	20,5 a	I
	$\Delta$ Glucose 2 Stdn. . . . .	5,3	5,5	5,5	4,2 b	
	O <sub>2</sub> mg Glucose 2 Stdn. . . . .	120	124,5	127	142	
Licht	$\Delta$ Glucose (gesamt) . . . . .	7,2	13,3	19,0	22,0 a	II
	$\Delta$ Glucose 2 Stdn. . . . .	7,2	6,1	5,7	3,0 b	
Je 2 Stdn. Licht nach Vorfütterung	$\Delta$ Glucose (gesamt) . . . . .	—	12,0	17,0	20,5 a	III
	$\Delta$ Glucose 2 Stdn. Licht . . . . .	—	6,7	6,2	4,2 b	

Tab. 8. Glucoseaufnahme in verschiedenen Zeitstufen. Erläuterung im Text. 48 Stdn. verarmte Algen;  $m/45$ -Phosphatpuffer  $p_H$  5,6; Belichtung:  $3,0 \mu\text{Mol}$  Quanten/min. Alle Angaben in mg.

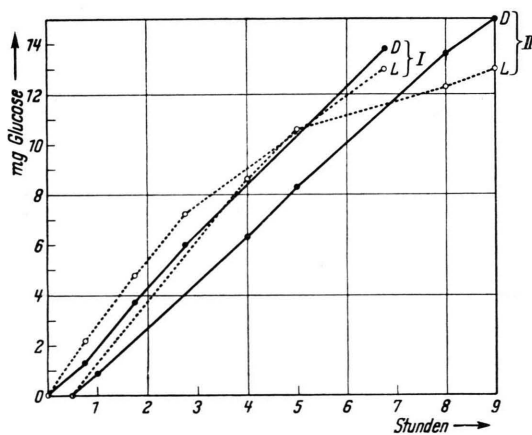


Abb. 9. Glucoseaufnahme in Licht bzw. Dunkelheit in Abhängigkeit von der Zeit. I: 24 Stdn. verarmte Algen, II: 48 Stdn. verarmte Algen. Material gleicher Ernte. Belichtung in beiden Fällen  $2,0 \mu\text{Mol}$  Quanten/min.

in eine Hemmung übergeht. Besonders anschaulich konnte dieser Rückstau der Assimilationsprodukte in folgender Versuchsanordnung gezeigt werden (Tab. 8): 11 Atmungsgefäße wurden in üblicher Weise mit je 3 ccm Algen + Glucose beschickt. 4 Gefäße wurden dauernd verdunkelt, 4 andere belichtet und jeweils in Abständen von 2 Stdn. je ein Gefäß der beiden Gruppen auf Restglucose untersucht. Die 3 restlichen Gefäße wurden zunächst ebenfalls verdunkelt, aber nach 2, 4 bzw. 6 Stdn. Verdunklung jeweils ein Gefäß für 2 Stdn. belichtet und dann ebenfalls analysiert. Die Reihen a der Tab. 8 enthalten die gefundenen Gesamtdifferenzen, die Reihen b die Glucoseaufnahme der jeweils letzten 2 Stdn. Diese ergibt sich in den Spalten I und II einfach durch Subtraktion zweier aufeinanderfolgender Werte der Reihe a. Die Proben der Spalte III sind alle je 2 Stdn. be-

lichtet, aber verschieden lange Zeit vorverdunkelt. Die Glucoseaufnahme für das 2-stdg. Lichtintervall ergibt sich dann durch Subtraktion der Glucoseaufnahme in der Vorverdunklungszeit, die aus Spalte I abgelesen werden kann, von der Gesamtaufnahme. Entsprechend den Befunden in Abb. 9 bleibt im Dunkeln die Glucoseaufnahme in den ersten 6 Stdn. gleich und fällt erst im letzten Intervall ab, was sich auch im Quotienten O<sub>2</sub>/mg Glucose auswirkt. Im Licht sinkt die Glucoseaufnahme von Anfang an ab und wird dann im 4. Intervall erheblich geringer als im Dunkeln, obwohl auch nach 8 Stdn. die Gesamtaufnahme im Licht noch größer erscheint, weil der Überschuß der ersten Stunden noch nicht ausgeglichen ist.

Werden die Algen 2 Stdn. im Dunkeln vorgefüttert, so bewirken 2 Stdn. Licht nicht mehr 7,2 mg Glucoseaufnahme wie bei den verarmten, sondern nur noch 6,7 mg. Dieser Wert liegt höher als der für die Glucoseaufnahme nach 2 Stdn. Vorfütterung im Licht, der nur 6,1 mg beträgt. Entsprechend werden nach 6 Stdn. Vorfütterung im Dunkeln nur noch 4,2 mg in 2 Stdn. Licht aufgenommen, was auch dem Dunkelwert des 4. Intervalls entspricht, aber wiederum deutlich über der Aufnahme nach entsprechender Vorfütterung im Licht liegt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Vorfütterung im Dunkeln nicht im gleichen Maß hemmend auf den Lichteinbau wirkt wie die in Licht. Vermutlich können im Licht auf Grund des durch die Hillreaktion verstärkten „Wasserstoffdruckes“ mehr stark hydrierte Assimilationsprodukte gebildet werden als im Dunkeln. Bei Vorfütterung im Licht werden dann alle Synthesewege, sowohl der zum Polysaccharid als auch die zu den hydrierten Produkten (Fett<sup>2</sup>) verstopft und der Einbau sinkt auf Grund der wiederholt erwähnten Kon-

	Verarmt		Vorgefüttert + Glucose		Vorgefüttert Glucose + NO <sub>3</sub>	
	+ Glucose	leer	+ Glucose	leer	+ Glucose + NO <sub>3</sub>	leer
— O <sub>2</sub> . . . . .	650	120	925	350	1306	497
Max QO <sub>2</sub> . . . . .	17,2	3,3	13,5	5,5	17,9	6,8
RO <sub>2</sub> . . . . .	1,20	0,90	1,29	1,05	1,35	1,10
Δ Glucose (Dunkel) . . . . .	4,9	—	5,9	—	6,0	—
Δ Glucose in % des Trockengewichts	26,5	—	19,7	—	18,7	—
O <sub>2</sub> /mg Glucose (gesamt) . . . . .	133	—	157	—	218	—
O <sub>2</sub> /mg Glucose (korrigiert)	108	—	97	—	135	—
CO <sub>2</sub> /mg (gesamt) . . . . .	159	—	202	—	295	—
CO <sub>2</sub> /mg (korrigiert) . . . . .	137	—	140	—	203	—
S. W. (gesamt) . . . . .	3,7	—	2,73	—	1,55	—
S. W. (korrigiert) . . . . .	4,45	—	4,35	—	2,7	—
+ O <sub>2</sub> . . . . .	800	—	1100	—	1250	—
Δ Glucose (Licht) . . . . .	5,6	—	5,4	—	6,3	—
Δ Glucose in % des Trockengewichts	30,5	—	18,0	—	19,6	—

Tab. 9. Glucoseumsatz nach verschiedener Vorbehandlung der Algen. Erläuterung im Text. Alle Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg.

kurrenz der CO<sub>2</sub>-Assimilationsprodukte unter den Wert der Dunkelproben ab. Dagegen werden bei Vorfütterung im Dunkeln vorwiegend Polysaccharide angesammelt, während andere Synthesewege nicht im gleichen Maße gesättigt werden, so daß bei nachfolgender Belichtung immer noch mehr eingebaut werden kann als bei entsprechender Vorfütterung im Licht.

Man könnte vielleicht auch annehmen, daß im Licht ein im Dunkeln nicht gangbarer Weg des Glucoseeinbaues zusätzlich benützt wird, der bei andauernder Belichtung durch Stauung der Assimilationsprodukte in den wegen Stickstoffmangels nicht vermehrungsfähigen Algen allmählich verstopft wird. In diesem Falle dürfte aber eine Vorfütterung im Dunkeln keinen Einfluß auf den Lichteinbau ausüben. Man muß also annehmen, daß die Synthesen in beiden Fällen grundsätzlich gleich sind und nur auf Grund von Gleichgewichtsverschiebungen, besonders in bezug auf den verfügbaren H hohen Potentials, unterschiedlich rasch ablaufen.

Eine Überprüfung und Ergänzung dieser Überlegungen stellt folgende Versuchsanstellung dar: 24 Stdn. verarmte Algen wurden in 3 Portionen aufgeteilt, von denen die eine weiterverarmt, die andere mit Glucose und die dritte mit Glucose + Nitrat gefüttert wurde. Nach 24 Stdn. wurden die verschiedenen Portionen erneut zentrifugiert, gründlich ausgewaschen (Kontrolle auf Bakterienfreiheit!), in m/45-Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 5,6 resuspendiert, mit Glucose versetzt und je 3 ccm in die Atmungsgefäße gegeben. Von jeder Gruppe war ein Gefäß mit

Algen ohne Glucose beschickt, um die Werte für die Leeratmung zu erhalten. Die Hälfte der Proben wurde belichtet, die andere Hälfte verdunkelt. In Tab. 9 sind die üblichen Daten für diese Versuchsanstellung zusammengestellt. Das Verhalten der Zellgrößen nach dieser Vorbehandlung der Algen ist schon im Zusammenhang mit Abb. 1 besprochen worden.

Wie aus der Tab. 9 hervorgeht, ist die Leeratmung der Kohlenhydrat-Stau-Zellen stark erhöht, die Glucoseatmung erniedrigt und auch die Glucoseaufnahme pro mg Trockensubstanz vermindert. Auf die Gesamtatmung bezogen ergibt sich ein erheblich verminderter synthetischer Wirkungsgrad, während bei Korrektur durch die Leeratmung der synthetische Wirkungsgrad gleich dem der verarmten Zellen wird. Daraus könnte man schließen, daß die über die Leeratmung hinausgehende Glucoseatmung mit gleichem Wirkungsgrad einbaut, daß aber die Assimilationsprodukte wieder beschleunigt abgebaut würden, wobei die dabei gewonnene Energie nur dem Betriebsstoffwechsel dient. Doch sind Spekulationen in dieser Richtung ohne Versuche mit markierter Glucose fruchtlos. Bei Belichtung wurde, entsprechend den vorhergehenden Versuchen, etwas weniger Glucose verbraucht als im Dunkeln.

Bei den mit Nitrat vorgefütterten „wachsenden Zellen“ entzieht die stark angekurbelte Proteinsynthese dem Glucoseeinbau offensichtlich soviel Energie, daß der synthetische Wirkungsgrad selbst nach Korrektur mit der ebenfalls stark erhöhten Leeratmung weit unter dem der verarmten Zellen

		I		II		III		IV	
		O <sub>2</sub> D		O <sub>2</sub> L		NL		Nr + Br.	
		Gluc.	O <sub>2</sub>	Gluc.	O <sub>2</sub>	Gluc.	O <sub>2</sub>	Gluc.	
Phosphatpuffer	p <sub>H</sub> 5,0	8,20	— 990	9,5	+1150	7,5	+200	7,1	—
	p <sub>H</sub> 6,2	8,8	—1000	9,5	+1180	7,5	+200	7,3	—
	p <sub>H</sub> 8,0	6,0	— 850	5,1	+1080	1,3	+150	1,0	—
Bicarbonatpuffer	p <sub>H</sub> 8,0	6,2	— 840	5,0	+1113	2,1	+800	0,9	—
	p <sub>H</sub> 9,5	3,1	— 610	1,8	+ 930	0,5	+750	0,5	—

Tab. 10. Glucose- und Sauerstoffverbrauch von 48 Stdn. verarmten Algen unter verschiedener Gasphase. Alle Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg.

liegt. Im Licht wird von diesen Zellen wieder etwas mehr Glucose aufgenommen als im Dunkeln. Durch die starke Eiweißsynthese kam es trotz der Glucosevorfütterung nicht zu der extremen Kohlenhydratstauung, und außerdem wird auch viel Energie zu den verschiedensten Wachstumsprozessen, die ja bei den Kohlenhydrat-Stau-Zellen weitgehend unterdrückt sind, verbraucht. Daher kann sich die Energielieferung durch die Photosynthese wieder auswirken.

Zur Beseitigung der Kohlenhydratstauung muß das Nitrat mindestens mehrere Stdn. einwirken können. Bei Versuchen, in denen zu Kohlenhydrat-Stau-Zellen einmal Glucose, das andere Mal Glucose + Nitrat gegeben wurde, konnte in den ersten 3 Stdn. noch kein Unterschied im Lichteinbau der Glucose bemerkt werden. Dagegen war nach 6 Stdn. die Hemmung des Glucoseeinbaues im Licht bei den Proben mit Nitratzusatz beseitigt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich auch wieder 1% der Zellen in Teilung.

### 3. Glucoseeinbau unter anaeroben Bedingungen

Nachdem in den vorhergehenden Versuchen die Bedingungen umrissen wurden, unter denen bei aeroben Verhältnissen ein gesteigerter Glucoseeinbau im Licht erfolgt, soll nunmehr der anaerobe Glucoseeinbau untersucht werden. Dazu wurden die Atmungsgefäße wie bei den früheren Versuchen beschickt, nur daß zu Versuchsbeginn an Stelle von O<sub>2</sub> 10 min lang hochgereinigter N<sub>2</sub> eingeleitet wurde. Werden die so behandelten Gefäße weiterhin im Dunkeln gehalten, so erfolgt keine Druckänderung, wenn KOH im Einsatz ist, und ein schwacher Druckanstieg, wenn keine KOH vorhanden ist. Diese minimale Gärung führt auch zu einem geringen

Glucoseverbrauch, der in 3 Stdn., der üblichen Versuchszeit, etwa 5% des Glucoseverbrauchs unter O<sub>2</sub> ausmacht.

Belichtet man die Algen unter diesen Bedingungen, so setzt Druckanstieg ein, der bei Verwendung von Phosphatpuffern etwa  $\frac{1}{4}$  des bei Benützung von Bicarbonat entstehenden beträgt. Daß der Druckanstieg wirklich auf O<sub>2</sub>-Entwicklung und nicht auf H<sub>2</sub>-Bildung beruht, geht daraus hervor, daß er ausbleibt, wenn an Stelle von KOH alkalische Pyrogalllösung im Einsatz war. Wegen der Trägheit der Absorption an Pyrogallol trat kurzfristig bei Versuchsbeginn ein kleiner Druckanstieg auf, der aber bald wieder verschwand. Untersucht man nach 3 Stdn. die Restglucose, so ergibt sich der in Tab. 10 dargestellte Sachverhalt. Bei p<sub>H</sub> 5,0 und 6,2 ist der Glucoseverbrauch im Licht unter N<sub>2</sub> nur wenig geringer (8,5% bzw. 15%) als im Dunkeln unter Sauerstoff. Dagegen ist er im Alkalischen, gleichgültig ob in Phosphat- oder Bicarbonatpuffer, weitgehend unterbunden. Der Glucoseeinbau im Licht unter N<sub>2</sub> zeigt also die gleiche p<sub>H</sub>-Abhängigkeit wie der vermehrte Lichteinbau unter O<sub>2</sub>, der aus den Spalten I und II zu entnehmen ist.

Man könnte vermuten, daß der photosynthetisch gebildete O<sub>2</sub> sofort wieder veratmet wird und daß dadurch auch unter N<sub>2</sub> im Licht eine oxydative Assimilation in größerem Umfang ermöglicht wird. Daß diese Rückreaktion nicht so rasch verläuft, geht schon aus der Tatsache hervor, daß ein Druckanstieg zustandekommt, der O<sub>2</sub> also in größerer Menge in den Gasraum entweicht. Wie groß die Atmungsintensität bei diesen geringen O<sub>2</sub>-Partialdrücken ist, läßt sich in sehr einfacher Weise ermitteln. Man schaltet mehrere Licht- und Dunkelintervalle hintereinander und berechnet auf Grund des Druck-



anstieges im Licht und dem bekannten Gefäßvolumen, wieviel %  $O_2$  nach bestimmten Belichtungszeiten vorhanden sind. Nach Verdunklung kann die Atmung gemessen werden, die durch ihren  $O_2$ -Verbrauch den  $O_2$ -Gehalt weiter verringert und somit direkt die Atmungskurve für diese untersten Bereiche der  $O_2$ -Spannung liefert. Wiederholt man den Licht-Dunkel-Wechsel, so kann man  $O_2$ -Gehalt und Atmung allmählich aufschaukeln. Nach Einblasen von Luft kann man dann den Maximalwert feststellen. Nach diesem Verfahren wurden die Kurven für die Abb. 9 gewonnen. Daraus geht hervor, daß die Glucoseatmung schon bei 3%, die Leeratmung bei 1,5% gesättigt ist. Bei dem Versuch in Tab. 10 entstanden z. B. bei  $p_H$  6,2 unter  $N_2$  im Licht 200 ccm  $O_2$ , die bei einem Volumen des Gasraumes von 10 ccm einen  $O_2$ -Partialdruck von 2% bewirkten. Bei diesem  $O_2$ -Gehalt ist die Glucoseatmung nur zu 75% gesättigt. Im Durchschnitt der gesamten Versuchsdauer können wir also höchstens 50% der vollen Glucoseatmung, wie sie im Gefäß mit  $O_2$  stattfand, annehmen. Die Glucoseabnahme betrug aber 85% der Abnahme unter Sauerstoff.

Im Bicarbonatpuffer betrug der  $O_2$ -Gehalt bei Versuchsende 8% und die Glucoseatmung ist dabei in vollem Umfang möglich. Trotzdem wurde nur sehr wenig Glucose verbraucht, weil einerseits die Atmung erst allmählich anlaufen mußte und andererseits weil im Alkalischen das Licht hemmend auf den Glucoseeinbau wirkt. Einen weiteren Beweis, daß der Glucoseeinbau im sauren Bereich unter  $N_2$  nicht auf oxydativer Assimilation, sondern auf Energielieferung von der Photosynthese beruht, kann man darin sehen, daß Zusatz von Pyrogallol den Glucoseverbrauch kaum beeinflusst. Unter diesen Bedingungen entsteht nur zu Versuchsbeginn ein minimaler  $O_2$ -Partialdruck von 0,2%, weil das Pyrogallol zu langsam absorbiert; aber dadurch wird nur eine ganz schwache Atmung von höchstens 10% der maximalen Glucoseatmung ermöglicht und nach einiger Zeit ist auch dieser wenige  $O_2$  absorbiert. Im Alkalischen führt dagegen der Pyrogallolzusatz zu einer weiteren Verschlechterung des Glucoseverbrauchs, bis zu so niederen Beträgen, daß die Genauigkeit der Bestimmung nur noch gering ist, da auch einige Zehntel mg durch die Gärung verbraucht werden.

Von besonderem Interesse ist die Abhängigkeit dieses Lichteinbaues von der Lichtintensität. Wie in den früheren Lichtstufungsversuchen wurden mit Absorptionsgittern wieder verschiedene Beleuchtungs-

stärken für die Kölbchen hergestellt. Abb. 11 zeigt die Kurven für die Glucoseabnahme und die  $O_2$ -Entwicklung innerhalb von 3 Stdn. in Abhängigkeit vom eingestrahlt Licht. Im Gegensatz zu den Befunden unter aeroben Bedingungen, wo maximaler Einbau schon bei 1,0  $\mu$ Mol Quanten/min erreicht wurde, sind unter  $N_2$  1,75  $\mu$ Mol Quanten/min not-

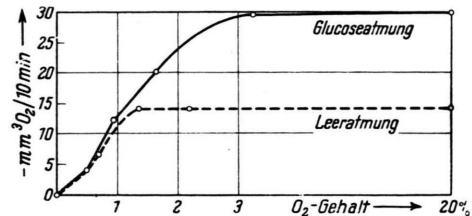


Abb. 10. Abhängigkeit der Atmungsintensität vom  $O_2$ -Gehalt der Gasphase. Erläuterung im Text.

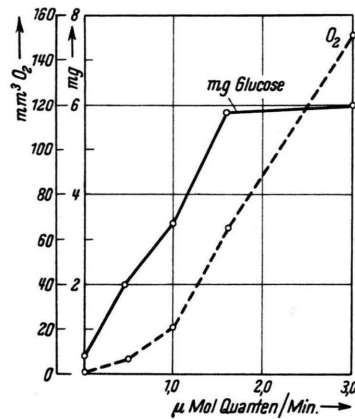


Abb. 11. Abhängigkeit der Glucoseaufnahme und der  $O_2$ -Produktion von der Belichtung. Gasphase  $N_2$ , 48 Stdn. verarmte Algen,  $m/45$ -Phosphatpuffer  $p_H$  5,6.

wendig. Dies ist verständlich, weil ja die Energie aus der verminderten Atmung erheblich geringer ist und daher mehr von der Photosynthese geliefert werden muß.

Die während der Versuchszeit entwickelte  $O_2$ -Menge bei Einstrahlung von 1,6  $\mu$ Mol Quanten/min betrug 65  $mm^3$ , das sind 0,65%  $O_2$ -Gehalt im Gasraum und reichen nur zu einer 25proz. Sättigung der Glucoseatmung aus. Trotzdem wurde beinahe der maximale Glucoseeinbau erreicht. Die  $O_2$ -Entwicklung steigt bei weiterer Steigerung der Belichtung noch weiter an, der Glucoseeinbau wird aber nur noch unwesentlich erhöht. Das spricht ebenfalls dagegen, daß die Glucoseabnahme im Licht unter  $N_2$  in vollem Umfang auf oxydativer Assimilation beruht.

Alle bisherigen Versuche waren so angestellt worden, daß gleichzeitig mit dem Einleiten des  $N_2$  die Belichtung einsetzte und keine längere Anaerobiose vorausging. Bekanntlich (Noak und Mitarbb.<sup>25</sup>, vgl. Rabinowitch<sup>13</sup>) tritt bei längerer Anaerobiose in saurerer Lösung eine vollkommene Hem-

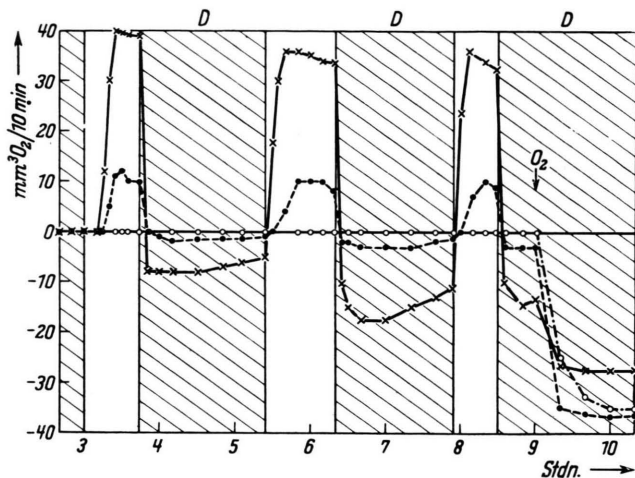


Abb. 12a.  $O_2$ -Verbrauch bzw. Produktion unter  $N_2$  bei Licht-Dunkel-Intervallen. In der Suspensionslösung 1% Glucose. I. Bicarbonatpuffer  $p_H$  8,0; II. Phosphatpuffer  $p_H$  8,0; III. Phosphatpuffer  $p_H$  5,6.

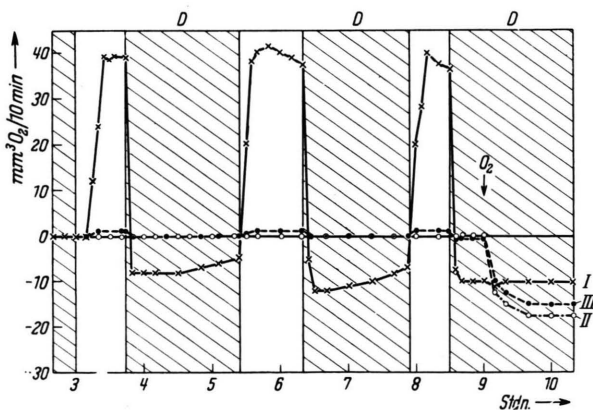


Abb. 12b. Wie Tab. 12a, aber ohne Glucose.

mung der Photosynthese ein. Diese konnte auch an unserem Material gezeigt werden, wenn Algen mit oder ohne Glucose in Bicarbonatpuffer bzw. in Phosphatpuffer von  $p_H$  8,0 bzw. 5,6 suspendiert und erst nach 3-stdg. Anaerobiose in den Atmungsgefäßen belichtet wurden. Abb. 12a zeigt den Gaswechsel in Licht- und Dunkelintervallen nach derartiger Vor-

behandlung. Während im Bicarbonat nur beim ersten Lichtintervall eine kurze Verzögerung beim Einsetzen der Photosynthese beobachtet werden konnte, tritt sie beim Phosphatpuffer von  $p_H$  8,0 jedesmal auf, da nur wenig  $O_2$  in der Lichtperiode gebildet wurde und die Algen weiterhin weitgehend anaerob gehalten wurden. Bei  $p_H$  5,6, wo nach den Angaben in Tab. 10 ungefähr die gleiche  $O_2$ -Entwicklung einsetzen müßte wie bei  $p_H$  8,0, ist die  $O_2$ -Entwicklung vollkommen gehemmt. Auch ohne Glucosezusatz (Abb. 12b) sind die Verhältnisse ähnlich, nur ist die  $O_2$ -Entwicklung in den Phosphatpuffern sehr gering.

Parallel zu dieser Anaerobiosehemmung der  $O_2$ -Entwicklung geht auch die Hemmung des Glucoseeinbaues, wie die Tab. 11 zeigt. Wird bei  $p_H$  5,6 erst nach 3 Std. Anaerobiose Licht geboten, dann erfolgt nur noch ein sehr minimaler Glucoseeinbau und es entsteht auch nur sehr wenig Sauerstoff. Diese geringe Menge  $O_2$  entstand erst gegen Ende der Versuchsperiode, vermutlich auf Grund einer Erholung, und wahrscheinlich ist auch die Glucoseaufnahme erst in diesem Zeitraum erfolgt. In den beiden ersten Std. nach Belichtung konnte keinerlei Druckanstieg beobachtet werden. In anderen, kürzeren Versuchen unterblieb der Glucoseverbrauch vollkommen. Die durch die Gärung verursachte Glucoseabnahme ist bei diesen Versuchen berücksichtigt, da Gefäße, die immer verdunkelt blieben, mitgeführt wurden und die Differenzen stets aus belichteten und unbelichteten nach gleicher Versuchszeit gebildet wurden.

Nimmt man an, daß die Anaerobiosehemmung bereits in der Hill-Reaktion angreift, so ist es selbstverständlich, daß auch die daran anschließenden Phosphorylierungen unterbleiben und kein Glucoseeinbau möglich ist. Weder die Atmungsfermente noch die Fermente des Glucoseeinbaues werden durch längere Anaerobiose gehemmt. Abb. 11 zeigt z. B. das sofortige Einsetzen der vollen Atmung, wenn  $O_2$  eingeleitet wird. In anderen Versuchen wurde die Glucoseaufnahme nach längerer Anaerobiose nach  $O_2$ -Zufuhr untersucht und es ergaben sich keine Anzeichen einer Nachwirkung der Anaerobiose.

## Diskussion

Die vorgelegten Befunde über einen „Lichteinbau“ von Glucose können, wie jeweils im Anschluß an die Besprechung der einzelnen Versuche bereits geschehen, zwanglos durch die eingangs skizzierte

<sup>25</sup> K. Noak, A. Pirson u. H. Michels, Naturwissenschaften 27, 645 [1939].

	Gasphase O <sub>2</sub>				Gasphase N <sub>2</sub>			
	Dunkel		Licht		Licht ohne Anaerobiose		Licht nach 3 Stdn. Anaerobiose	
	Gluc.	- O <sub>2</sub>	Gluc.	+ O <sub>2</sub>	Gluc.	+ O <sub>2</sub>	Gluc.	+ O <sub>2</sub>
Phosphat 5,6 . . . . .	6,5	880	7,6	1080	5,6	+150	1,4	+ 22
Bicarbonat 8,0 . . . . .	5,4	650	4,7	1150	1,8	+700	2,0	+690

Tab. 11. Glucoseverbrauch in 3 Stdn. unter O<sub>2</sub> bzw. N<sub>2</sub> vor und nach 3 Stdn. Anaerobiose. Angaben in mm<sup>3</sup> bzw. mg.

Arbeitshypothese erklärt werden, daß unter bestimmten Bedingungen die ATP-Versorgung den Minimumfaktor für den Glucoseeinbau darstellt und daß durch ATP-Lieferung aus der Photosynthese maximaler Glucoseeinbau erreicht wird. Sie finden eine geradezu ideale Ergänzung in den während der Durchführung dieser Arbeit erschienenen Untersuchungen von Grube<sup>4</sup> und Simonis und Grube<sup>5</sup>.

Grube fand, daß bei Elodeablättchen auch bei Abwesenheit von CO<sub>2</sub> noch eine beträchtliche Menge radioaktiven Phosphats bei Belichtung mehr in das TES-lösliche organische Phosphat eingebaut wird als im Dunkeln. Da er den Nachweis einer Parallelität zwischen CO<sub>2</sub>-Assimilation und Phosphateinbau führen wollte, war dieses Ergebnis für ihn nicht ganz befriedigend und er betonte daher besonders die Tatsache, daß immerhin etwas weniger markiertes Phosphat bei CO<sub>2</sub>-Mangel aufgenommen wurde als bei guter CO<sub>2</sub>-Versorgung. Ich sehe in diesem Ergebnis einen sehr schönen Beweis der Grundkonzeption oben entwickelter Arbeitshypothese, daß ohne CO<sub>2</sub>-Assimilation mit Hilfe von Folgereaktionen der photochemischen Wasserspaltung  $\sim$ ph erzeugt und dadurch die verschiedensten Synthesen in der Zelle ausgeführt werden können. Der damit verbundene lebhaftete Phosphatumsatz ermöglicht dann den gesteigerten Austausch von normalem gegen markiertes Phosphat. Daraus geht allerdings in keiner Weise hervor, daß auch der Absolutbetrag der nunmehr stärker markierten Fraktionen erhöht ist.

In direktem Zusammenhang mit vorliegender Arbeit stehen die Untersuchungen von Simonis und Grube<sup>5</sup> über den Einbau von markiertem Phosphat während des Glucoseumsatzes. Ebenfalls von der Vorstellung ausgehend, daß im Zuge der Photosynthese erzeugtes  $\sim$ ph auch außerhalb der CO<sub>2</sub>-Assimilation verwendet werden kann, stellten sie fest, daß bei Glucosezugabe und gleichzeitiger Be-

lichtung erheblich mehr P<sup>32</sup> in das TES-lösliche organische Phosphat aufgenommen wird als im Dunkeln. Sie nehmen an, daß Glucose vermehrt phosphoryliert wird, was zu einem Anstieg des Phosphats in dieser Fraktion führt. Da gleichzeitig auch mehr <sup>32</sup>P im anorganischen Phosphat auftrat, glaubten sie weiter, daß bei der Extraktion ein Teil der labileren Phosphatverbindungen wieder gespalten wurde. Diese Deutung halte ich nicht für notwendig. Grundsätzlich muß nochmals daran erinnert werden, daß vermehrtes <sup>32</sup>P in einer Fraktion durchaus nicht gleichbedeutend ist mit einem Anstieg des Absolutbetrages dieser Fraktion. Letzteres läßt sich nur durch eine quantitative Analyse beurteilen. Es ist dagegen ein sicherer Indikator dafür, daß die Umsatzgeschwindigkeit in dieser Fraktion gesteigert und daß dadurch die Austauschmöglichkeit erheblich günstiger ist. So sehe ich in diesen Befunden einen weiteren Beweis dafür, daß im Zuge der Photosynthese anorganisches Phosphat in  $\sim$ ph überführt, von hier auf Glucose-1-phosphat übertragen und bei der Polysaccharidsynthese wieder als anorganisches Phosphat frei wird. Bei Verwendung von <sup>32</sup>P, wie es Simonis und Grube taten, kommt es dann zu dem beschriebenen Effekt.

Ebenfalls von großem Interesse ist der Befund von Simonis und Grube<sup>5</sup>, daß im Anschluß an die Belichtung erst nach der Verdunklung gebotenes <sup>32</sup>P ebenfalls verstärkt im TES-löslichen organischen und anorganischen Phosphat auftritt. In eigenen Versuchen<sup>1</sup> konnte früher gezeigt werden, daß das anorganische Phosphat in den ersten min nach der Verdunklung ansteigt, was als Übergangspänomen von der stationären Phase im Licht zu der im Dunkeln gedeutet wurde, wobei die Dephosphorylierung die Phosphorylierung für einige Zeit etwas überwiegt. Das bedeutet nicht, daß die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit dabei absolut geringer ist als im stationären Dunkelzustand. Im Gegenteil,

wenn Veränderungen im Phosphat Spiegel auftreten, so ist dies meist ein Zeichen für gesteigerten Umsatz, und die Richtung der Veränderung ist lediglich der Ausdruck der relativen Geschwindigkeiten. So ist es gut verständlich, daß in diesem Zeitraum gebotenes  $^{32}\text{P}$  rasch in beide Fraktionen eingelagert wird. Die eigenen quantitativen Untersuchungen sowohl über den Phosphatstoffwechsel wie über den Glucoseeinbau stehen also mit den Befunden von Simonis und Grube<sup>5</sup> in bester Übereinstimmung und ergänzen sich gegenseitig.

Alle diese Untersuchungen erhärten weiter die Annahme, daß im Zuge der Photosynthese chemische Energie in Form von  $\sim\text{ph}$  entsteht, vermögen aber

nur wenig darüber auszusagen, auf welche Weise sie gebildet wird. Sicher scheint zu sein, daß die Bildung von  $\sim\text{ph}$  unabhängig von der  $\text{CO}_2$ -Assimilation erfolgt, vielleicht sogar eine Alternative zu dieser darstellt. Vorversuche über die Wirkung einer Reihe von Atmungsgiften auf den „Lichteinbau“ der Glucose haben gezeigt, daß es eventuell möglich ist, eine Hemmungsanalyse der lichtbedingten Phosphorylierung anzusetzen, die eine nähere Charakterisierung dieser Vorgänge ermöglicht.

Die Untersuchungen wurden bereits im Herbst 1950 begonnen, konnten aber erst nach Überlassung einiger Apparate durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, der ich an dieser Stelle meinen Dank dafür aussprechen möchte, abgeschlossen werden.

## Mikroskopisch-elektrophysiologische Untersuchung des Internodiums der markhaltigen Nervenfasern unter Einwirkung von Saponin und Elektrolyten

Von MASAYASU SATO\* und DIETRICH SCHNEIDER

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Kühn, Tübingen

(Z. Naturforschg. 9 b, 644—654 [1954]; eingegangen am 25. August 1954)

The effects of various substances upon the myelin sheath of a nerve fibre have been examined by recording the action current through the myelin sheath as well as by taking its microphotographs at the same time. — (1) Saponine remarkably increased the current through the myelin sheath and prolonged the conduction time until the conduction of impulses failed. Conspicuous changes in the structure of the myelin sheath and axoplasm were observed, which is in good agreement with the electrical changes. The electrical changes could be interpreted as due to the decrease of the axon resistance by gradual penetration of saponine. — (2)  $\text{KOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , concentrated  $\text{NaCl}$  and  $\text{KCl}$  affected the myelin very slowly compared with saponine, but they increased the myelin current relative to the nodal current. The structural changes were quite different from those due to saponine. — (3) Several other electrolytes, even in very high concentrations, showed little effect upon the electrical properties of the internodal fibre, although marked structural changes were noticed.

Die kürzlich erschienenen zusammenfassenden Darstellungen<sup>1-3</sup> zeigen uns, daß die Analyse der Funktion und Struktur markhaltiger Nervenfasern große Fortschritte gemacht hat. Dabei vollzog

sich die morphologische Forschung weitgehend unabhängig von der physiologischen, denn nur in wenigen neueren Arbeiten<sup>4-10</sup> wird überhaupt versucht, bei simultaner optisch-physiologischer Kontrolle mit Nervenfasern zu experimentieren. Die vorliegende Arbeit beabsichtigt zu zeigen, daß es möglich ist, die

\* Derzeitige Anschrift: Department of Physiology, Kumamoto University College of Medicine, Kumamoto, Japan.

<sup>1</sup> A. v. Muralt, Die Signalübermittlung im Nerven. Birkhäuser, Basel 1946.

<sup>2</sup> R. Stämpfli, Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 47, 70 [1952].

<sup>3</sup> I. Tasaki, Nervous Transmission, Springfield, Ill., USA, C. C. Thomas, 1953.

<sup>4</sup> A. Engström u. H. Lüthy, Experientia [Basel] 5, 244 [1949]; Exper. Cell Res. 1, 81 [1950].

<sup>5</sup> D. K. Hill, J. Physiology 111, 285, 304 [1950].

<sup>6</sup> D. K. Hill u. R. D. Keynes, J. Physiology 108, 278 [1949].

<sup>7</sup> H. Lüthy, Helv. physiol. pharmacol. Acta 6, C 28 [1948].

<sup>8</sup> S. N. Shaw u. J. M. Tobias, Biol. Bull. 101, 229 [1951].

<sup>9</sup> D. Schneider, Z. Naturforschg. 7b, 38 [1952].

<sup>10</sup> G. Svaetichin, Acta physiol. scand. 24, Suppl. 86, 23 [1951]; J. M. Tobias, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 17, 15 [1952]; J. M. Tobias u. S. Solomon, J. cellular comparat. Physiol. 35, 25 [1950]; S. Solomon u. J. M. Tobias, Biol. Bull. 99, 345 [1950]; 101, 198, 213 [1951].