

Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese I

Phosphatpiegelschwankungen bei *Chlorella pyrenoidosa* als Folge des Licht-Dunkel-Wechsels

Von OTTO KANDLER *

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

(Z. Naturforsch. 5b, 423–437 [1950]; eingegangen am 28. November 1950)

1. *Chlorella pyrenoidosa* wurde in phosphatfreiem Medium suspendiert und nach entsprechender Vorbehandlung in 6-proz. Trichloressigsäure (TES) abgetötet und extrahiert. Das im TES-Auszug bestimmbare anorganische Phosphat wies in den ersten 30 Sek. nach Beginn der Belichtung eine Verminderung um 20%, in den ersten 90 Sek. nach der Verdunklung eine Vermehrung um 30% auf, während die stationären Licht- und Dunkelzustände keine wesentlichen Verschiebungen hervorriefen.

2. Eine kurzdauernde Atmungssteigerung im Anschluß an eine Belichtungsperiode konnte beobachtet und mit den Phosphatpiegelschwankungen in Zusammenhang gebracht werden.

3. In diesen Beobachtungen wird der Beweis für die seit einiger Zeit diskutierte Ansicht, daß ein Teil der Lichtenergie auf dem Wege über das energiereiche Phosphat in „chemische Energie“ umgewandelt wird, gesehen.

4. Die Möglichkeiten der Phosphatbindung im Rahmen der photochemischen Reaktionskette werden besprochen und in entsprechende Schemata eingebaut.

5. Als primäre Produkte der Photoreaktion werden ein an einen H-Acceptor mittleren Potentials gebundener Wasserstoff und energiereiche Phosphate angesehen. Mit deren Hilfe könnte nicht nur die CO₂-Assimilation, sondern auch die Reduktion und der Einbau von Nitrat und Sulfat und der Umbau von Kohlenhydraten und anderer sauerstoffreicher Verbindungen zu sekundären Pflanzenstoffen und Wuchsstoffen durchgeführt werden. Ein entsprechendes Schema der Photosynthese wird entworfen.

Die weitgehende Aufklärung des Atmungsstoffwechsels und seiner Zwischenprodukte führte in den letzten Jahren zu neuen Vorstellungen über den Energiehaushalt der Zelle. Bereits 1905 stellten Harden und Young¹ einen Zusammenhang zwischen Phosphorsäure und alkoholischer Gärung fest, und Warburg und Christian² konnten die Aufnahme anorganischen Phosphats bei der Triosephosphatdehydrierung nachweisen. Genauere Vorstellungen über die Bedeutung und Natur der im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratabbau gebildeten energiereichen Phosphate (~ph) entwickelten Lipmann und Kalckar³, und in jüngster Zeit gab Oesper⁴ einen Überblick über die bisher bekannten Formen an energiereichen Phosphatbindungen.

Während die mit den verschiedenen Dehydrierungsschritten des Kohlenhydratabbaues über Gly-

cerinaldehyd-Brenztraubensäure (BTS) und dem Citronensäurezyklus gekoppelten Phosphorylierungen seit längerer Zeit untersucht und weitgehend geklärt sind⁵, konnte die beim Wasserstoff- bzw. Elektronentransport von den Dehydrasen zum Sauerstoff seit langem vermutete Phosphatbindung erst in jüngster Zeit von Lynen und Holzer sowie Friedkind und Lehninger⁶ unabhängig voneinander experimentell bestätigt werden. Die erstgenannten Autoren stellen diesen Vorgang als sogenannte „Fermentketten-Phosphorylierung“ der früher bekannten „Substrat-Phosphorylierung“ gegenüber. Damit wurde das Bild von der Gewinnung chemischer Energie in Form von ~ph mit Hilfe des dissimilatorischen Stoffwechsels weitgehend abgerundet.

Vogler⁷ übertrug wohl als erster die Vorstellungen von der Rolle der Phosphorsäure als Energieüberträger und Energiespeicher von heterotrophen

* Hrn. Prof. Dr. F. Lynen und Hrn. Dr. H. Holzer vom Chem. Institut der Univ. München bin ich für zahlreiche Diskussionen zu vorliegender Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

¹ A. Harden u. W. Young, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B 21, 189 [1905].

² O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 303, 46 [1939].

³ F. Lipmann, Adv. Enzymology 1, 99 [1941]; H. M. Kalckar, Chem. Rev. 28, 71 [1941].

⁴ P. Oesper, Arch. Biochem. 27, 255 [1950].

⁵ F. Lynen, Naturwiss. 30, 398 [1942].

⁶ F. Lynen u. H. Holzer, Liebigs Ann. Chem. 563, 213 [1949]; M. Friedkind u. A. L. Lehninger, J. biol. Chemistry 174, 757 [1948].

⁷ K. G. Vogler, J. gen. Physiol. 26, 103 [1942].

Organismen auf autotrophe und konnte bei *Thiobacillus thiooxydans* die Koppelung von Schwefel-oxydation und Bildung von \sim ph nachweisen. Umbreit⁸ glaubt, daß diese Phosphatbindung bei der Passage von Elektronen durch ein Cytochromsystem erfolgt, also nach dem oben erwähnten Typ der Fermentketten-Phosphorylierung vor sich geht. Analog zu diesen Befunden stellte Ruben⁹ 1943 die Hypothese auf, daß auch bei der Photosynthese grüner Pflanzen die zur CO₂-Reduktion notwendige Energie aus mit Hilfe von Lichtenergie gebildetem \sim ph stammt, konnte aber keinen experimentellen Beitrag dazu liefern. Emerson, Stauffer und Umbreit¹⁰ diskutieren dieses Problem ausführlich und untersuchten verschiedenste Phosphatfraktionen in belichteten und verdunkelten *Chlorella*-Suspensionen, ohne aber für obige Auffassung verwertbare Ergebnisse zu erzielen. Weitere Untersuchungen über den Phosphathaushalt von *Chlorella* wurden ausschließlich mit radioaktivem Phosphor ausgeführt. In allen diesen Fällen konnte naturgemäß nur der Austausch von Phosphat zwischen Außenlösung und Zelle untersucht werden, nicht aber der Wechsel zwischen anorganischem und organisch gebundenem Phosphat innerhalb der Zelle selbst. So fanden Aranoff und Calvin¹¹ keinen Unterschied in der Aufnahme von Radiophosphor durch belichtete oder verdunkelte Blätter und Algen. Gest und Kamen¹² untersuchten besonders die Abhängigkeit des Phosphatgehalts der Zelle von der Konzentration des Phosphats in der Kulturflüssigkeit und dessen Auswaschbarkeit aus der Zelle. Wassink, Tjia und Winterstein¹³ konnten bei Purpurbakterien (*Chromatium*) eine verstärkte Abgabe von anorganischem Phosphat im Dunkeln und eine entsprechende Aufnahme im Licht feststellen. Unmittelbare Schlüsse auf eine Phosphorylierung durch Lichtenergie lassen sich aber auch daraus nicht ziehen. In einer ausführlichen Studie über den Phosphathaushalt verschiedener Einzeller berichten Kamen und Spiegelmann¹⁴, ebenfalls über Phosphataustausch zwischen Zelle und Suspensionsflüssigkeit und stellen ältere Ergebnisse zusammen.

Die Reversibilität zahlreicher Teilreaktionen des

⁸ W. W. Umbreit, Bacteriol. Rev. **11**, 157 [1947].

⁹ S. Ruben, J. Amer. chem. Soc. **65**, 279 [1943].

¹⁰ R. Emerson, J. F. Stauffer u. W. W. Umbreit, Amer. J. Bot. **31**, 107 [1944].

¹¹ S. Aranoff u. M. Calvin, Plant Physiology **23**, 354 [1948].

¹² H. Gest u. M. D. Kamen, J. biol. Chemistry **176**, 299 [1948].

Atmungsstoffwechsels legte die in neuerer Zeit wiederholt vertretene Anschauung nahe, daß die CO₂-Assimilation in wesentlichen Teilen eine Umkehr der Dissimilation darstellt. Einen umfassenden Überblick über das einschlägige Schrifttum gab kürzlich Pirson¹⁵, so daß hier auf eine nähere Darstellung verzichtet werden kann. Besonders überzeugend sind zwei durch Versuche mit radioaktivem C¹⁴ erwiesene Tatsachen: 1. Die rasche Verteilung des eingebauten C¹⁴ in die verschiedensten Zellbestandteile¹⁶. 2. Der auch im Dunkeln sich vollziehende dauernde Einbau von CO₂ aus der umgebenden Atmosphäre. (Brown, Fager und Gaffron¹⁷ konnten z. B. bei *Scenedesmus* zeigen, daß der laufende Dunkeleinbau von CO₂ 2% der CO₂-Assimilation im Licht beträgt.)

Der Einbau von CO₂ wäre demnach eine enzymatische Dunkelreaktion, die Wasserstoff und \sim ph verbraucht. Diese beiden Komponenten müßten durch die photochemische Reaktion geliefert werden. Ziel vorliegender Arbeit war es, durch die Untersuchung des „anorganischen Phosphatpiegels“ in der Zelle beim Licht-Dunkel-Wechsel, die Beteiligung der Photosynthese am Phosphathaushalt nachzuweisen.

A. Material und allgemeine Methodik

Verwendet wurde ausschließlich ein Stamm von *Chlorella pyrenoidosa* mit sehr kleinen, nur 2—3 μ großen Zellen. Die Kultur erfolgte in Gaswaschflaschen mit einem Volumen von 300 bis 500 cm³ in einem Gewächshaus des Instituts bei Tageslicht und einer nächtlichen Zusatzbeleuchtung durch eine 60-Watt-Lampe (etwa 1000 Lux). Durchlüftet wurde mit Hilfe eines von einer Wasserstrahlpumpe erzeugten Luftstromes, dem aus einer Kohlensäurebombe etwa 2% CO₂ beigemischt waren. Die Temperatur wies, den Gewächshausbedingungen entsprechend, einen Tagesgang zwischen 18°C und 30°C auf. Die Zusammensetzung der Nährlösung war folgende: 0,4 g KNO₃, 0,1 g Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,1 g MgSO₄·7H₂O, 0,1 g KCl, 0,1 g KH₂PO₄·H₂O, Spur Fe₂(SO₄)₃, 1 cm³ Hoaglandsche A-Z-Lösung, 1000 cm³ Aqua dest. Diese

¹³ E. C. Wassink, J. E. Tjia u. J. F. G. M. Winterstein, Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **52**, 412 [1949].

¹⁴ M. D. Kamen u. S. Spiegelmann, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **13**, 151 [1948].

¹⁵ A. Pirson, Fortschr. Bot. **12**, 247 [1949]; Naturwiss. **37**, 241 [1950].

¹⁶ M. Calvin u. A. A. Benson, Science [New York] **107**, 476 [1948]; S. Aranoff u. L. Vernon, Arch. Biochem. **27**, 239 [1950].

¹⁷ H. H. Brown, E. W. Fager u. H. Gaffron, Arch. Biochem. **19**, 407 [1948].

Nährlösung weist im Gegensatz zu den von anderen Autoren angegebenen eine sehr geringe Nährsalzkonzentration auf. Dies erwies sich als vorteilhaft, da bei höheren Salzkonzentrationen im Laufe der Kultur Ausfällungen von Carbonaten und Phosphaten auftraten, die schwer zu entfernen waren und bei den Phosphatbestimmungen störten.

Das Wachstum war unter den angegebenen Bedingungen sehr gut. Zu Kulturbeginn wurden jeweils 2 cm³ einer dichten Suspension in jede Gaswaschflasche gegeben, so daß die Kulturflüssigkeit bereits einen deutlichen grünen Schimmer aufwies. Nach 48 bis 72 Std. hatten sich die Algen in der Regel auf das 10- bis 15-fache vermehrt und konnten verwendet werden. Vor jedem Versuch wurde das Material auf seine Reinheit untersucht. Traten mehr als 1% andersartige Algen auf, so wurde die Suspension nicht mehr zur Weiterkultur verwendet, sondern neues Material von Reinkulturen, die auf Nährsalzagar in Reagensgläsern gezogen wurden, verwendet.

In vorliegender Arbeit war die genaue Bestimmung der Zelldichte der bei den einzelnen Versuchsreihen verwendeten Algensuspensionen nur von geringerer Bedeutung. Gewöhnlich wurde die in 1 cm³ enthaltene Algenmasse nach Abschluß des Versuches durch Trockengewichtsbestimmung festgestellt. Vor Versuchsbeginn erfolgte die ungefähre Einstellung der gewünschten Dichte durch einfache Abschätzung der mehr oder weniger tiefgrünen Färbung, was bei einiger Übung mit hinreichender Genauigkeit möglich ist. Wichtig war hingegen, daß innerhalb einer Versuchsreihe die Suspension völlig homogen war und jede entnommene Probe einen zuverlässigen Querschnitt der gesamten Masse darstellte. Außerdem mußte die Möglichkeit bestehen, möglichst rasch einen Licht-Dunkel-Wechsel vorzunehmen und die Zeit zur Entnahme der Proben auf wenige Sekunden zu beschränken. Zu diesem Zweck wurde die in folgendem beschriebene Abfüllvorrichtung* benützt.

Die Abfüllvorrichtung, von der Abb. 1 einen schematischen Querschnitt zeigt, besteht aus einem Glas Kolben (K), der unten einen großen Hahn (H), oben einen Schliff trägt. In den Kolben ragt ein Einsatz (E) hinein, in dem sich eine an ein Glasrohr (R₁) angeschmolzene Niedervoltlampe (L) befindet. Zur Kühlung der Lampe dient ein Wasserstrom, der durch das Glasrohr (R₂), in dem R₁ mit Hilfe eines Gummi-

stopfens befestigt ist, an die Lampe herangeführt wird und aus dem Ansatzstutzen des Einsatzes (E) wieder abfließt. Da das Kühlwasser auch die im Kolben befindliche Algensuspension abkühlen würde, muß es die für den Versuch gewünschte Temperatur haben. Es konnte also kein Leitungswasser verwendet werden, sondern es wurde aus einem Ultrathermostaten (nach Höppler) Wasser konstanter Temperatur durchgepumpt.

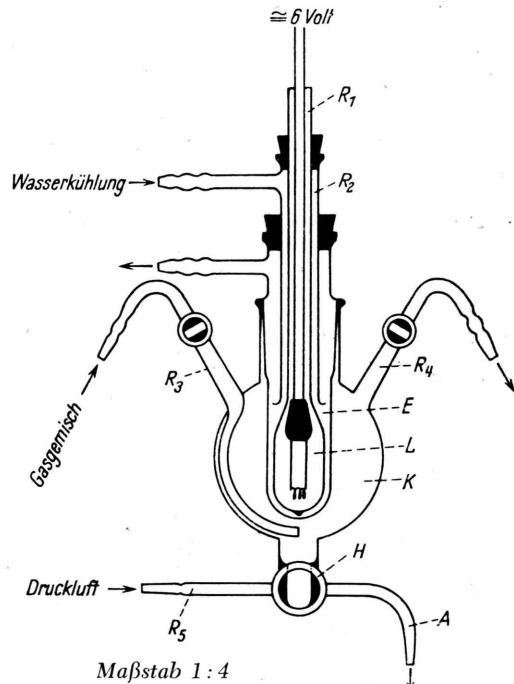


Abb. 1. Schematischer Querschnitt durch die Abfüllvorrichtung. (Erklärung im Text.)

Die Durchlüftung der Algensuspension mit dem jeweils notwendigen Gasgemisch ermöglicht das in den Kolben eingeschmolzene Glasrohr (R₃), das unmittelbar über dem Ansatz des Hahnes mündet und durch einen Glashahn verschlossen werden kann. Der Abzug des Gases erfolgt durch das angeschmolzene Glasrohr (R₄), das ebenfalls mit einem Glashahn versehen ist. Zur Entnahme der Proben dient der Glashahn (H), der ein sehr großes, rund 3 cm³ fassendes Kücken besitzt. Bei senkrechter Stellung desselben füllt dieses sich auf Grund seiner großen Öffnung innerhalb von 1 Sek. und bei waagrechter Stellung und leichter Neigung des Kolbens läuft es durch den Abfluß (A) rasch aus, da durch das Rohr (R₅) Luft Zutreten kann. Besonders rasch und restlos erfolgt die Entleerung, wenn an das Rohr R₅ Druckluft gelegt

* Die Abfüllvorrichtung wurde nach einem Entwurf von Hrn. Dr. K. Buchta durch Hrn. Glasbläsermeister Wolf der Firma Bender u. Hobein, München, hergestellt.

wird. Die Preßluft wurde einer Stahlflasche entnommen und mit Hilfe eines Wasserventils ein konstanter Druck von 30 cm H₂O eingestellt.

Da der Kolben mit Eisenlack außen schwarz gestrichen war, ließ sich der Licht-Dunkel-Wechsel durch Ein- und Ausschalten der Lampe sehr leicht durchführen. Bei Verwendung einer 35-Watt-Auto-

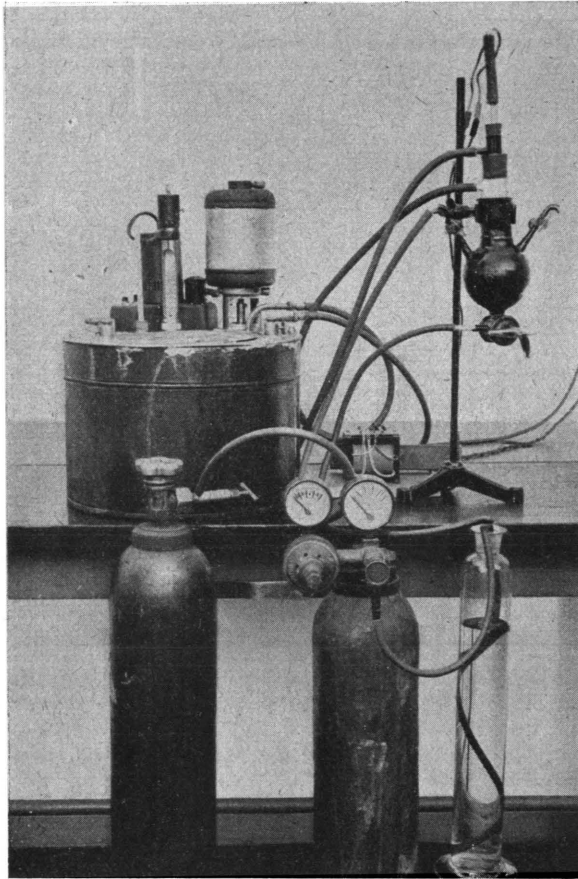


Abb. 2. Betriebsfertige Anordnung der Abfüllvorrichtung mit Hilfsgeräten.

lampe herrschte an der Oberfläche des Einsatzes eine Beleuchtungsstärke von etwa 4000—6000 Lux. Sollte eine Algensuspension verarmt werden, so wurde sie in den Kolben gefüllt, dieser an einem Stativ befestigt und die entsprechende Zeit Sauerstoff durchgeleitet. Während des Versuches selbst war es vorteilhaft, die Abfüllvorrichtung mit der einen Hand unter fortwährendem Schütteln zu halten und mit

der anderen den Hahn zu betätigen. Abb. 2 zeigt die betriebsfertige Vorrichtung mit allen Nebengeräten.

Die durch Wägung bestimmte Menge der bei einer Hahndrehung entnommenen Suspension betrug $2,992 \text{ cm}^3 \pm 1\%$. Waren für eine Probe größere Mengen erforderlich, so wurden unmittelbar hintereinander 2 Proben entnommen. Der Minimalabstand zwischen 2 Entnahmen betrug 3 Sekunden.

Die quantitative Bestimmung des anorganischen Phosphats im Trichloressigsäure-Auszug erfolgte nach der Methode von Martland und Robison¹⁸: Zu 1 cm^3 30-proz. H₂SO₄ und 1 cm^3 10-proz. Ammonmolybdatlösung wird die zu untersuchende Lösung gegeben und nach Hinzufügen von 1 cm^3 einer Lösung von 20 g wasserfreiem Natriumbisulfit und 0,5 g Hydrochinon in 100 cm^3 Wasser auf 15 cm^3 aufgefüllt. Die allmählich sich entwickelnde Blaufärbung wird nach 30 Min. mit dem Pulfrich-Photometer (30-mm-Küvette) ausgemessen. Die Umrechnung der Extinktionswerte auf die Absolutbeträge an PO₄''' erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve, die bei jeder Versuchsreihe durch Kontrollmessungen an eingewogenem PO₄''' überprüft wird.

Die manometrischen Atmungs- und Assimilationsmessungen wurden mit der Warburg-Apparatur nach den Angaben von Dickens¹⁹ ausgeführt. Verwendet wurden kegelförmige Gefäße mit Mittelseinsatz und seitlich angesetzter Birne mit einem Volumen von rund 15 cm^3 . Die Bestimmung der Volumina erfolgte durch Auswiegen mit Hg. Belichtet wurde mit Hilfe von verschiedenen stabförmigen Lampen von unten durch den Glasboden des Thermostaten, der durch einen Blechschieber in kürzester Zeit verdunkelt werden konnte. Oben war der Thermostat mit einem Preßstoffdeckel abgedeckt, der Aussparungen für den Durchtritt der Manometerkapillaren aufwies. Die Aussparungen waren mit schwarzem Tuch abgedeckt, so daß der Thermostat vollständig verdunkelt war.

Die bei den Belichtungsversuchen in den Atmungsgefäßen absorbierte Lichtmenge wurde mit dem von Warburg und Schocken²⁰ entwickelten manometrischen Actinometer bestimmt. Dazu diente folgender Ansatz: In 10 cm^3 Pyridin wurden 0,4 g Thioharnstoff gelöst und so viel Äthylchlorophyllid (hergestellt aus Dahlienblättern nach der Vorschrift von Willstätter und Stoll²¹) zugegeben, daß voll-

¹⁸ M. Martland u. R. Robison, *Biochem. J.* **20**, 848 [1926].

¹⁹ F. Dickens, *Methoden der Fermentforschung* von Bamann u. Myrbäck, Leipzig 1941, S. 985.

²⁰ O. Warburg u. V. Schocken, *Arch. Biochem.* **21**, 363 [1948].

²¹ R. Willstätter u. A. Stoll, *Untersuchungen über Chlorophyll*, Berlin 1913.

ständige Lichtabsorption gewährleistet war (Kontrolle der vollständigen Absorption durch Parallelproben mit höheren Chlorophyllkonzentrationen). 3 cm³ dieser Lösung wurden in ein Atmungsgefäß gegeben und nach Einleiten reinen Sauerstoffs so lange im Dunkeln geschüttelt, bis keine Druckdifferenzen mehr auftraten. Dann wurden die entsprechenden Lampen eingeschaltet und die Sauerstoffaufnahme gemessen. Da die Photooxydation des Thioharnstoffes mit der Quantenausbeute 1 verläuft, entspricht jedem absorbierten Lichtquant eine verbrauchte Molekel O₂. Die Lichtmenge kann also unmittelbar in mm³ O₂ oder in Mikromolen Quanten/Min. angegeben werden.

Um Atmung und Assimilation mit der Warburg-Technik abwechselnd zu messen, mußte bisher die Gefäßpaar-Methode benützt oder bei Verwendung der direkten Methode mit sehr alkalischen Carbonat-Bicarbonatpuffern gearbeitet werden. Einen wesentlichen Fortschritt bedeutet demgegenüber die von Pardee²² kürzlich vorgeschlagene Verwendung eines CO₂-Puffers, der einen konstanten CO₂-Partialdruck im Gasraum aufrechterhält und an Stelle der Lauge in den Mitteleinsatz gegeben wird. Auf Grund zahlreicher Vergleichsproben wurde folgender Ansatz als günstig befunden: 10 cm³ Diäthanolamin (60-proz.), + 2 cm³ 6-n. HCl, + 1,0 g KHCO₃, werden auf 15 cm³ aufgefüllt und bleiben in einer verschlossenen Flasche 12 Stdn. stehen. Zur Atmungsmessung werden dann 0,75 cm³ dieser Lösung an Stelle der KOH in den Mitteleinsatz des Atmungsgefäßes gegeben. Zur Vergrößerung der Absorptionsfläche empfiehlt sich ein möglichst großer Filtrierpapierfächer. Die Einstellung des Gasgleichgewichtes erfordert längere Zeit als bei Benützung von KOH. Vor Beginn der Messung müssen die Manometer etwa 30 Min. geschüttelt werden. Der genaue CO₂-Gehalt der Gasphase bei Verwendung der angegebenen Mischung wurde noch nicht bestimmt. Er dürfte nach den Tabellen von Pardee²² zwischen 0,2 und 0,5% betragen. Vergleichsmessungen an gleichen Algen-suspensionen unter Verwendung von KOH und Carbonat-Bicarbonatpuffern ergaben gleiche Atmungs- und Assimilationswerte wie bei Benützung von Diäthanolamin als Absorptionsmittel.

B. Versuchsergebnisse

1. Methodische Vorversuche über den Phosphathaushalt von *Chlorella*

Um das in der Zelle vorhandene anorganische Phosphat bestimmen zu können, wurden die Algen zu-

	γ PO ₄ ^{'''} / 10 cm ³	
1. Waschwasser	25,4	26,0
2. Waschwasser	4,5	3,9
3. Waschwasser	0,8	0,7
4. Waschwasser	0,5	0,6

Tab. 1. Abnahme des Phosphatgehalts im Waschwasser der Chlorellen.

nächst so lange auf der Zentrifuge gewaschen, bis alles frei diffusible Phosphat beseitigt war. Tab. 1 zeigt die Abnahme des Phosphatgehalts des Waschwassers. Dabei wurden die Algen in jeweils 200 cm³ phosphatfreier Kulturlösung aufgeschwemmt und nach 1-stdg. Stehenlassen wieder mit etwa 1000-facher Erdbeschleunigung abzentrifugiert. Nach 3-maligem Auswaschen liegt, wie aus der Tab. hervorgeht, außerhalb der Zellen praktisch kein Phosphat mehr vor. Nur wenn die Algen im Dunkeln viele Stunden (12—48 Stdn.) unter Durchspülung mit Sauerstoff aufbewahrt werden, tritt in der Außenlösung wieder eine kleine Menge Phosphat auf. Daher wurden in allen künftigen Versuchen die Algen nach dem Verarmen im Sauerstoffstrom noch einmal abzentrifugiert und erneut suspendiert.

Von einer so vorbehandelten Algensuspension wurden mit einer Pipette 5 cm³ entnommen und in 5 cm³ 12-proz. Trichloressigsäure (TES) gegeben, wo die Zellen sofort abgetötet, durch Ausfällung des Eiweißes die Fermentreaktionen gestoppt und die Plasmagrenzschichten für alle löslichen Stoffe permeabel werden. Sowohl das in der lebenden Zelle zurückgehaltene anorganische PO₄^{'''} als auch das organisch gebundene sogenannte säurelösliche Phosphat (Glucosephosphat, Adenosintriphosphat usw.) gehen in Lösung, und nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile kann in der klaren überstehenden Lösung nach der oben erwähnten Methode das „anorganische Phosphat“ bestimmt werden. Das säurelösliche organische Phosphat ergibt sich erst nach Veraschung mit H₂SO₄.

Seit langer Zeit ist die Frage, ob das im TES-Auszug bestimmbare anorganische Phosphat wirklich als freies PO₄^{'''} vorlag oder erst durch die hydrolysierende Wirkung der TES aus vielleicht adsorptiver Bindung freigesetzt wurde, umstritten. In jüngster Zeit konnten sowohl Holzer und Lynen als auch Green und Mitarbeiter²³ zeigen, daß ein großer

²² A. Pardee, J. biol. Chemistry **179**, 1085 [1949].

²³ H. Holzer und F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. **569**, 138 [1950]; D. E. Green, W. A. Atchley, J. Nordmann und L. J. Tely, Arch. Biochem. **24**, 359 [1949].

	$\gamma \text{ PO}_4'''$		
1. Fraktion	31,0	30,5	31,2
2. Fraktion	5,6	5,5	5,8
3. Fraktion	1,3	1,0	1,3
4. Fraktion	0,8	0,7	0,7
Gesamtes anorganisches Phosphat . .	38,1	37,7	38,0

Tab. 2. Abnahme des Phosphatgehalts in aufeinanderfolgenden Fraktionen des TES-Auszuges.

Teil desselben an Plasmastrukturen gebunden ist; die erstgenannten Autoren bezeichnen es als „Struktur-Phosphat“ (S-ph). Ob dieses S-ph, das nur im Zusammenhang mit Dissimilationsvorgängen (Atmung, Gärung) gebildet wird, energiereich oder -arm (im Sinne Lippmanns³⁾ ist, kann vorläufig noch nicht entschieden werden. Es liegt aber wahrscheinlich auf einem niederen Energieniveau und stellt eine Phosphatreserve der Zelle dar²⁴. Die Bindung an die Struktur macht es vielleicht überhaupt erst möglich, daß die Zelle auch im phosphatfreien Medium ihren normalen Stoffwechsel aufrechterhalten kann und erst nach längerer Zeit Phosphatmangelercheinungen auftreten. In eigenen Versuchen konnte jedenfalls durch Zugabe von Phosphat zu kürzere Zeit (12—48 Stdn.) phosphatfrei gehaltenen Algen keinerlei Steigerung der Atmung oder Assimilation erreicht werden. Dagegen erwähnt Pirson¹⁵, daß bei in Phosphatmangelkulturen gezüchteten Chlorellen ein deutlicher Effekt bei Phosphatzugabe beobachtet werden kann.

In vorliegender Arbeit ist mit dem Ausdruck „anorganisches Phosphat“ die Gesamtheit des im TES-Auszug unmittelbar bestimmbar PO₄''', das sich aus „wahrem anorganischen Phosphat“ und S-ph zusammensetzt, gemeint. Dessen Abhängigkeit von der Konzentration, Einwirkungsdauer und Temperatur der zur Extraktion benützten TES wurde bei Hefe von Lynen und Holzer⁶ eingehend untersucht, und die entsprechenden eigenen Versuche an *Chlorella* führten zu gleichsinnigen Ergebnissen. Eine Endkonzentration der TES von 6% und eine Extraktionszeit von 1 Stde. bei Zimmertemperatur lieferten sehr konstante Werte. Vielfach wird eine fraktionierte Extraktion vorgeschlagen, da im ersten Auszug noch nicht alles PO₄''' gelöst erscheint. Tab. 2 zeigt den Phosphatgehalt von 4 aufeinanderfolgenden Fraktionen bei 3 Parallelproben, die aus je 5 cm³ einer Suspension mit 5 mg Trockensubstanz/cm³ bestanden.

²⁴ L. J. T e p l y, Arch. Biochem. 24, 383 [1949].

Der Rückstand wurde mit je 10 cm³ 6-proz. TES erneut 10 Min. extrahiert. Aus Tab. 2 geht hervor, daß in der ersten Fraktion etwa 82% des anorganischen Phosphats erfaßt werden und daß die zurückgehaltene Menge bei allen Proben den gleichen Anteil des Gesamtbetrages darstellt. Es war daher für unsere Untersuchungen, bei denen es sich immer nur um Relativwerte innerhalb einer größeren Serie von Proben der gleichen Suspension handelte, nicht nötig, eine frak-

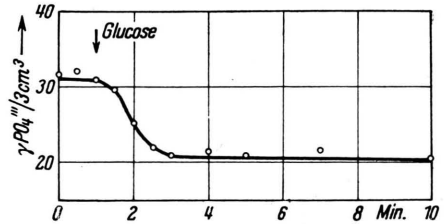


Abb. 3. Anorganischer Phosphatspiegel in Abhängigkeit von der Zeit bei Zugabe von Glucose. (p_{H} 5,6, t 22° C Gasphase Carbogen, 8 mg Trockensubstanz/cm³.)

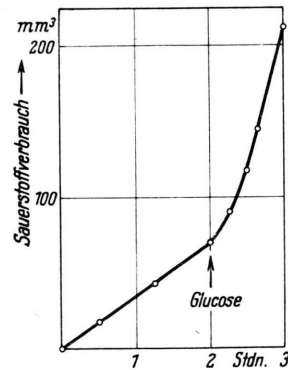


Abb. 4. Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei Zusatz von 1% Glucose. (Gasphase Sauerstoff, $t = 30^\circ \text{C}$ im übrigen wie bei Abb. 3.)

tionierte Extraktion vorzunehmen. Diese würde außerdem die Gefahr in sich bergen, daß durch die lang Einwirkungsdauer der TES doch Phosphat auch an energiereicher organischer Bindung abgespalten und der Wert verfälscht würde.

Da über die Kinetik des Phosphatstoffwechsels bei *Chlorella* noch keine Angaben vorliegen, wurde zu nächst ein bei der Hefe gut bekannter Vorgang, der Einbau anorganischen Phosphats in organische Bindung bei Glucoseveratmung, untersucht. Dazu wurden von einer 48 Stdn. im Sauerstoffstrom verarmte *Chlorella*-Suspension vor und nach Zugabe von Glucose (Endkonzentration 1%) mehrere Proben in

kurzen Abständen entnommen und, wie oben beschrieben, das anorganische Phosphat bestimmt. Parallel dazu wurde an einer Probe manometrisch die Sauerstoffaufnahme gemessen. Abb. 3 und 4 zeigen die entsprechenden Kurven. Das Ergebnis entspricht völlig den Erwartungen. Gleichzeitig mit dem starken Anstieg des Sauerstoffverbrauchs sinkt der anorganische Phosphat Spiegel um etwa 30% ab und stellt sich nach 2 Min. wieder auf ein konstantes Niveau ein. Unterschiede zu dem Verhalten der Hefe bestehen nur in quantitativer Beziehung. Es muß allerdings betont werden, daß bei nicht verarmter *Chlorella* diese Effekte nicht oder nur sehr schwach auftreten. Es erschien also möglich, die bei der Hefe entwickelten Vorstellungen und Methoden zur Analyse des Phosphatstoffwechsels mit einiger Vorsicht auch auf *Chlorella* zu übertragen.

2. Änderungen des anorganischen Phosphat spiegels beim Licht-Dunkel-Wechsel

Neben verschiedenen anderen Phosphatfraktionen untersuchten Emerson und Mitarbeiter¹⁰ auch den anorganischen Phosphat Spiegel bei belichteten und verdunkelten *Chlorellen*, ohne aus den geringen auftretenden Unterschieden weitere Schlüsse ziehen zu können. Diese Untersuchungen bezogen sich aber auf den stationären Zustand im Licht bzw. 90 Min. und mehr nach der Verdunklung. Nun sagt aber der anorganische Phosphat Spiegel nichts über die absolute Größe der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Geschwindigkeit, sondern nur über deren gegenseitiges Verhältnis etwas aus. Die Befunde der oben genannten Autoren stellen also kein negatives Ergebnis dar, sondern zeigen nur, daß das Gleichgewicht zwischen beiden Reaktionen im Licht und in Dunkelheit annähernd gleich ist. Meßbare Änderungen im anorganischen Phosphat Spiegel ergeben sich nur dann, wenn die Geschwindigkeitsänderungen der beiden entgegengesetzten Reaktionen nicht synchron erfolgen. Im oben angeführten Fall der Glucoseveratmung durch verarmte *Chlorellen* wurde z. B. durch die einsetzende verstärkte Atmung, wie sie aus der manometrischen Messung ersichtlich ist, die Phosphorylierung stark beschleunigt und der Phosphat Spiegel sank so lange, bis sich ein neues dynamisches Gleichgewicht zur Dephosphorylierung eingestellt hatte. Ein erneuter Anstieg wäre sowohl durch eine Beschleunigung der Dephosphorylierung, als auch durch ein Absinken der Phosphorylierung

z. B. bei Verbrauch der zugesetzten Glucose möglich.

Entsprechend diesen Überlegungen galten unsere Untersuchungen nicht den stationären Zuständen, sondern den Induktionsperioden beim Licht-Dunkel-Wechsel. Es war zu hoffen, daß die vermutete Beteiligung der Photosynthese am Phosphathaushalt Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Geschwindigkeit nicht völlig gleichzeitig in gleichem Maße beeinflußt und so im anorganischen Phosphat Spiegel Pendelbewegungen hervorruft.

100 bis 150 cm³ einer 24 Stdn. verarmten Algen suspension (2—5 mg Trockensubstanz pro cm³) wur-

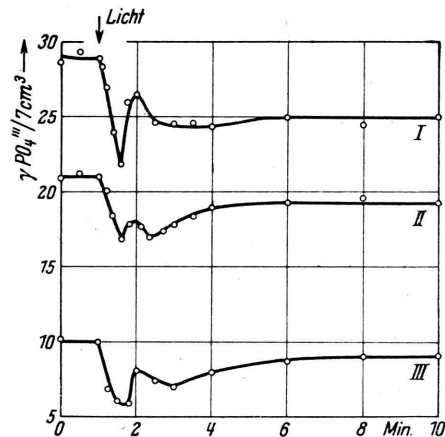


Abb. 5. Phosphat Spiegel schwankungen beim Übergang von Dunkelheit in Licht. (Bei Kurve I und II Benützung der Abfüllvorrichtung. Kurve III ist um 10 Einheiten nach unten verschoben.)

den in einen, mit Ausnahme des Bodens, schwarz gestrichenen Erlenmeyerkolben von 1000 cm³ Fassungsvermögen gegeben und unter heftigem Schütteln mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) durchlüftet. Mit einer Pipette wurden dann in kurzen Abständen 3 Proben von je 7 cm³ entnommen und möglichst rasch in TES gegeben. Dann wurde die Suspension mit einer 200-Watt-Lampe von unten mit etwa 6000 Lux beleuchtet und die Entnahme der Probe in kurzen Abständen fortgesetzt. Da das Pipettieren immerhin einige Sekunden in Anspruch nimmt, in denen die Algen sich im Halbdunkel der Pipette befinden, bevor sie in der TES abgetötet werden, und eine genaue Abmessung der entnommenen Probe bei rascher Entnahme nicht möglich ist (in diesen Fällen wurden die genauen Mengen durch Wägung festgestellt), wurde die eingangs beschriebene Abfüllvorrichtung entworfen, mit der später die Versuche ausgeführt wurden.

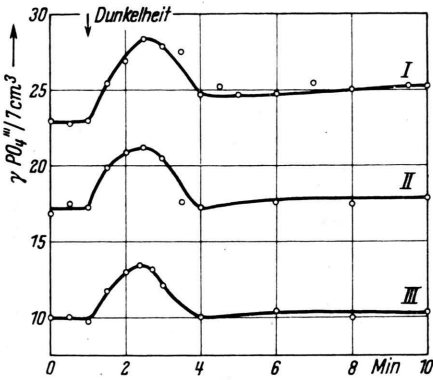


Abb. 6. Phosphatspiegelschwankungen beim Übergang von Licht in Dunkelheit. (Bei Kurve I und III Benützung der Abfüllvorrichtung.)

Abb. 5 zeigt 3 Kurven, in denen die auf 7 cm^3 Suspension bezogene Menge an anorganischem Phosphat in Abhängigkeit von der Zeit beim Übergang von Dunkel in Licht dargestellt ist. Mit dem Einsetzen der Belichtung fällt der anorganische Phosphatspiegel innerhalb der ersten 30 Sek. rasch um etwa 20% ab und steigt nach einer bei verschiedenen Versuchen mehr oder weniger ausgeprägten Pendelbewegung bis etwa 10% unter den Ausgangswert wieder an. Trotz zahlreicher Versuche, von denen die dargestellten 3 Kurven nur typische Beispiele sind, gelang es bisher nicht, die Ursachen für die verschieden starke Ausbildung des 2 Min. nach der Belichtung auftretenden Zwischenmaximums zu klären. In einigen Fällen überschritt es sogar die Werte des Dunkelniveaus. Auch die Differenz zwischen den Niveaus der stationären Zustände im Dunkeln und Licht wies größere Schwankungen auf, wie auch aus den Kurven hervorgeht. In keinem Falle aber lag das Niveau im Licht höher als im Dunkeln.

Analog den obigen Versuchen wurde auch der Licht-Dunkel-Wechsel untersucht, und Abb. 6 zeigt 3 charakteristische Kurven, wie sie in vielen Versuchen reproduziert werden konnten. Mit der Ver-

dunklung steigt der anorganische Phosphatspiegel steil an und erreicht nach $1\frac{1}{2}$ Min. seinen Höchststand, der in der Regel 25%—30% über dem Ausgangswert liegt, in extremen Fällen aber auch 50% erreichen kann. Nach 3 Min. hat sich bereits wieder ein neues Gleichgewicht eingestellt, das etwa 10% über dem Niveau im Licht liegt. Auch hier war die Differenz zwischen Ausgangs- und Endniveau bei verschiedenen Versuchen nicht gleich, wie auch die dargestellten Kurven zeigen. Allgemein war die Differenz beim Übergang Licht—Dunkel geringer als im umgekehrten Fall. Dies hängt wahrscheinlich mit der später zu besprechenden schwachen Atmungssteigerung durch Assimilationsanreicherung im Anschluß an eine Belichtung zusammen.

Den Übergang Dunkel—Licht—Dunkel im Zusammenhang zeigt die in Abb. 7 wiedergegebene Kurve. In diesem Fall ist die Differenz zwischen dem Phosphatniveau in Licht und Dunkelheit besonders ausgeprägt, wie es nur selten beobachtet wurde. Zu bemerken ist noch, daß die beobachteten Induktionsphänomene bei Verwendung sehr dichter Algensuspensionen verwischt werden und auch ganz ausbleiben können. In diesen Fällen ist es nicht mehr möglich, die Suspension wirklich gleichmäßig zu durchleuchten, und auch die Gasversorgung der einzelnen Zellen dürfte wegen der Trägheit der Diffusion bereits leiden. Besonders zu Beginn vorliegender Arbeiten wurde wiederholt versucht, durch Verwendung von Algensuspensionen mit mehr als 10 mg Trockensubstanz pro cm^3 höhere Phosphatwerte und damit auch größere absolute Differenzbeträge zu erhalten. Mehrere Mißerfolge führten dann wieder zur Verwendung dünnerer Suspensionen.

C. Manometrische Messungen des Gasstoffwechsels beim Licht-Dunkel-Wechsel

Die allgemeine Annahme, daß die Atmungsrate grüner Pflanzen im Dunkeln und im Licht gleich ist,

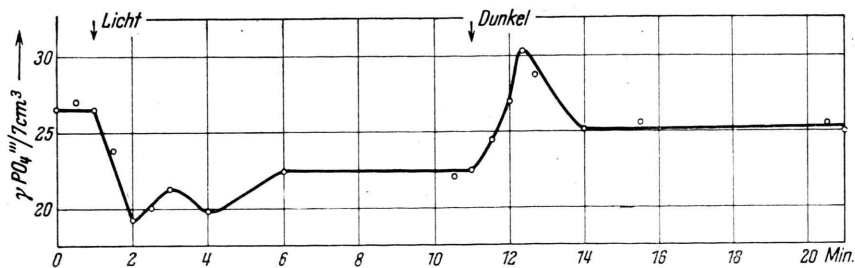


Abb. 7. Phosphatspiegelschwankungen beim Übergang Dunkel—Licht—Dunkel. (Abfüllvorrichtung benützt.)

blieb nicht unwidersprochen. So fand van der Paa u w²⁵ eine starke Erhöhung der Atmungsrate im Anschluß an die Belichtung und folgerte daraus, daß die Atmung während der Belichtung sehr stark gesteigert ist und in der anschließenden Dunkelperiode nur noch der Abfall der Atmungskurve erfaßt wird. Dagegen fordert K o k²⁶ als Vertreter der Reversibilitätstheorie eine weitgehende bis vollständige Hemmung der Atmung während der Assimilationsperiode. Daß nach längerer Assimilationsdauer eine leichte, nur langsam abklingende Atmungssteigerung auftritt, ist durch mehrere Arbeiten²⁷ belegt und auf die bessere Versorgung mit Assimilaten zurückzuführen. Ein unmittelbarer Einfluß des Lichtes auf die Atmung auch bei nicht grünen Geweben²⁸ wird dagegen von anderen Autoren nicht bestätigt (S a g r o m s k y²⁷, vgl. G a f f r o n²⁹), und auch eigene Versuche in dieser Richtung verliefen gänzlich negativ. Warburg und Mitarbeiter³⁰ konnten in neuerer Zeit sehr überzeugend zeigen, daß langwelliges Licht bei gleichzeitiger Unterbindung der CO₂-Assimilation keinen Einfluß auf die Atmung ausübt. Die durch kurzwelliges Licht hervorgerufenen Atmungssteigerungen sind vermutlich auf Plasmaschädigungen zurückzuführen, die durch die Entkopplung des Phosphorylierungsmechanismus stets zu gesteigerter Sauerstoffaufnahme führen.

Die Frage nach einer kurzfristigen Atmungssteigerung im Anschluß an eine Belichtungsperiode wurde in eigenen Versuchen überprüft. Die Verwendung des eingangs beschriebenen CO₂-Puffers schien dafür besonders geeignet zu sein, da in diesem Falle auch saure, für die Algen wesentlich günstigere Puffer benützt werden konnten als bei der bisherigen Carbonat-Bicarbonat-Methode. Verwendet wurden im allgemeinen dichte Suspensionen, die maximale Absorption¹ gewährleisteten. Die Beleuchtungsstärke wurde zwischen 300 und 1200 Lux variiert. Die in den Gefäßen absorbierte Lichtmenge schwankte dementsprechend zwischen 0,53 Mikromolen Quanten/Min. und 1,87 Mikromolen Quanten/Min. Die Versuchstemperatur betrug 30° C. Da bei Belichtung in den Algensuspensionen auf Grund der starken Lichtabsorption momentane Erwärmungen und damit Druckänderungen auftreten, die durch das mit Wasser

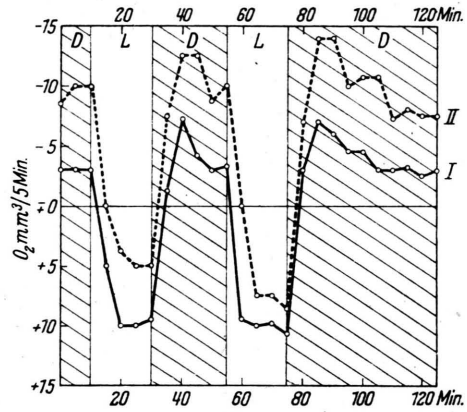


Abb. 8. Abhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit vom Licht-Dunkel-Wechsel. Kurve I verarmte, Kurve II mit 1% Glucose gefütterte Algensuspension.

beschickte Thermobarometer nicht auskorrigiert werden können, wurde in ein zweites Thermobarometer stets die gleiche Menge durch Kochen abgetötete Algensuspension gegeben. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 5 Min. und wurden mit einer Katasterlupe vorgenommen, da die Druckdifferenzen zum Teil sehr gering waren.

Abb. 8 zeigt 2 Kurven, in denen der Sauerstoffverbrauch pro 5 Min. in Abhängigkeit vom Licht-Dunkel-Wechsel dargestellt ist. Dabei bezieht sich Kurve I auf eine verarmte, Kurve II auf eine mit Glucose gefütterte Algensuspension. In beiden Fällen tritt im zweiten 5-Min.-Intervall nach der Verdunklung ein Maximum des Sauerstoffverbrauchs auf. Der prozentuale Anteil der Atmungssteigerung ist in beiden Fällen verschieden, der absolute Betrag aber annähernd gleich. Diese starke, rasch abklingende Erhöhung der Atmungsrate nach der Belichtung erscheint also unabhängig von der Menge des verfügbaren Atmungssubstrates. Es handelt sich hierbei um einen anderen Effekt als bei der oben erwähnten langdauernden Atmungserhöhung. Dagegen scheint es sich bei den von E m e r s o n und L e w i s³¹ mitgeteilten Befunden um die gleiche Erscheinung zu handeln. Durch verfeinerte Ablesevorrichtungen gelang es, Druckdifferenzen von $\frac{1}{100}$ mm in Abständen von 1 Min. zu registrieren, und auch dabei ergaben sich 4–5 Min. nach der Verdunklung die größten Raten der O₂-Aufnahme. Da aber wegen der Trägheit des

²⁵ F. v a n d e r P a a u w, Recueil Trav. bot. néerl. **29**, 497 [1932].

²⁶ B. K o k, Enzymologia **13**, 1 [1947].

²⁷ F. G e s s n e r, Planta **29**, 165 [1938]; H. S a g r o m s k y, Planta **33**, 299 [1943].

²⁸ C. M o n t f o r t u. H. F ö c k l e r, Planta **28**, 515 [1938].

²⁹ H. G a f f r o n, Biol. Zbl. **59**, 302 [1939].

³⁰ O. W a r b u r g, D. B u r k, V. S c h o c k e n, M. K o r e n o v s k y u. S. B. H e n d r i c k s, Arch. Biochem. **23**, 330 [1949].

³¹ R. E m e r s o n u. C. M. L e w i s, Amer. J. Bot. **30**, 165 [1943].

Gasdruckausgleiches die ersten Ablesungen keine richtigen Werte liefern, nehmen Emerson und Lewis an, daß es sich nur noch um den Abfall einer während der Belichtung stark gesteigerten Atmung handelt. Zeichnet man die gedachte Atmungskurve so wie Emerson und Lewis (l. c. ³¹, Abb. 2) es durchführen, so ergibt sich im Laufe der Belichtung eine Steigerung der Assimilationsleistung von 25%.

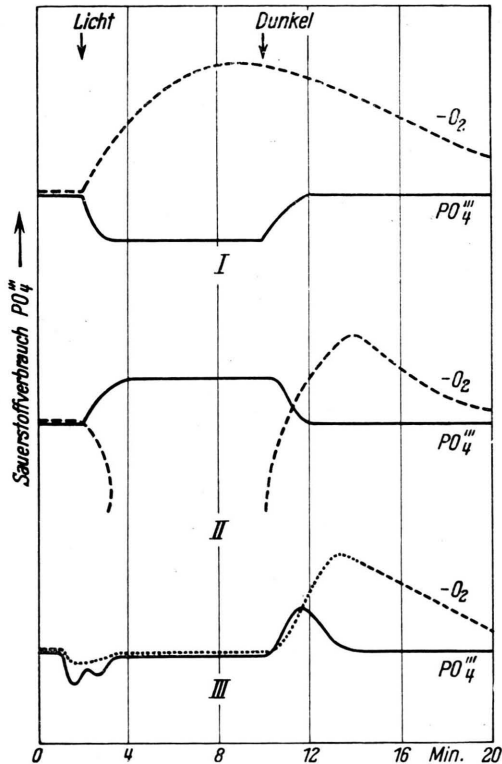


Abb. 9. Schematische Darstellung der Kurven für Atmungsintensität (Sauerstoffverbrauch) und anorganisches Phosphat für den Fall einer Atmungssteigerung (I) und einer Atmungshemmung (II) während der Belichtung. (III) Experimentell gefundene Kurven mit hypothetischer Ergänzung der Atmungskurve.

Hält man dagegen die Assimilationsleistung konstant, so ergibt sich nur eine geringe Atmungssteigerung während der Belichtung und ein steiler Anstieg der Atmungsrate in den ersten Minuten nach der Verdunklung, der nach etwa 4—5 Min. sein Maximum erreicht und dann wieder abklingt. Welche Deutung zutrifft, ist mit der manometrischen Methode nicht zu entscheiden, da auch bei bester Ablesetechnik die Trägheit des Druckausgleiches nicht überwunden

³² K. Egle u. A. Ernst, Z. Naturforschg. 4b, 351 [1949].

werden kann. Vielleicht würde sich der in neuerer Zeit von Egle und Ernst ³² für physiologische Versuche benützte Ultrarot-Absorptionsschreiber besser dafür eignen.

Nimmt man an, daß die Photosynthese den Phosphatumsatz nicht unmittelbar beeinflusst, so wäre der anorganische Phosphatspiegel nur von der Atmung abhängig und würde beim Licht-Dunkel-Wechsel den in Abb. 9 I wiedergegebenen Änderungen unterworfen sein, wenn die Atmung während der Belichtung gesteigert ist. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 9 II die entsprechende Kurve, wenn nach der Annahme von Kok ²⁶ die Atmung durch die Photosynthese gehemmt wird. In Abb. 9 III ist die experimentell gefundene Kurve für den Phosphatspiegel und der ebenfalls gesicherte Teil der Atmungskurve schematisch dargestellt. Der vermutete Verlauf der Atmungskurve ist punktiert eingetragen. Die Gegenüberstellung zeigt deutlich, daß die Atmungsschwankungen zur Erklärung der Phosphatspiegelschwankungen nicht ausreichen. Es erscheint dagegen wahrscheinlich, daß die Änderungen der Atmungsrate durch die Phosphatverschiebungen hervorgerufen werden, wie später ausgeführt wird.

Abschließend muß noch erwähnt werden, daß die Atmungssteigerung bei schwachen Lichtintensitäten nicht oder nur sehr schwach auftrat. Sie konnten allerdings bei den Beleuchtungsstärken, wie sie auch bei den Untersuchungen des Phosphatspiegels verwendet wurden, mit großer Regelmäßigkeit festgestellt werden.

D. Diskussion der Ergebnisse

Die in den Abb. 5, 6 und 7 dargestellten Schwankungen des anorganischen Phosphatspiegels im Zusammenhang mit dem Licht-Dunkel-Wechsel beweisen die Beteiligung der Photosynthese am Phosphatstoffwechsel der Zelle. Sie lassen sich in folgender Weise zwanglos deuten: In der verarmten und verdunkelten Algenzelle liegt eine bestimmte Menge anorganischen Phosphats (vermutlich in lockerer Bindung mit Strukturelementen des Plasmas) vor, von der im Zusammenhang mit der Dissimilation dauernd ein Teil in organische Bindung überführt wird, während die energiezehrenden Prozesse den gleichen Teil anorganischen Phosphats aus \sim ph wieder freisetzen, woraus ein konstanter Phosphatspiegel resultiert. Mit dem Einsetzen der Belichtung wird in engem Zusammenhang mit der photochemischen Reaktion zusätzlich \sim ph gebildet und der Phosphatspiegel sinkt ab. In diesem Stadium muß auch mit einer Beeinflus-

	E_0' in Volt (p_H 7,0)	ΔE	ΔF (in kcal)		
HZ \rightleftharpoons Z	- 1,0	} - 0,72	- 16,5	} n = 1	
Acetaldehyd (+ H ₂ O) \rightleftharpoons Essigsäure	- 0,47				
Äthylalkohol \rightleftharpoons Acetaldehyd	- 0,16	} - 0,22	- 5,0		
Hydro-Codehydrase \rightleftharpoons Codehydrase	- 0,28				
Leukoflavinferment \rightleftharpoons Flavinferment	- 0,06	} - 0,32	- 7,5		
Cytochrom b.	- 0,04				
Fe ⁺⁺ \rightleftharpoons Fe ⁺⁺⁺ {	Cytochrom c.	+ 0,27	} - 0,02		- 0,5
	Cytochrom a.	+ 0,29			
	Cytochromoxydase.	?			
2 OH ⁻ \rightleftharpoons O ₂	+ 0,81	} - 0,52	- 12		

Tab. 3. Zusammenstellung der ΔF -Beträge für die Verschiebung eines H-Atoms über verschiedene Redox-Systeme (modifiziert nach Lynen und Holzer⁷).

sung der Atmung durch die Photosynthese gerechnet werden, da beide miteinander in Konkurrenz um das anorganische Phosphat treten. Kurze Zeit nach der Belichtung setzt aber auch bereits eine \sim ph verbrauchende Dunkelreaktion ein, die innerhalb von 3—5 Min. zu ihrer vollen Geschwindigkeit ansteigt und damit das alte Phosphatniveau wieder annähernd herstellt. Im stationären Zustand der Photosynthese besteht also keine Konkurrenz um das anorganische Phosphat mehr, da Atmung und Assimilation ihren eigenen Phosphatkreislauf besitzen. Erst wenn bei der Verdunklung die Photoreaktion schlagartig unterbrochen wird, die Dunkelreaktion aber noch kurze Zeit nachklingt, kommt es zu einer erneuten Gleichgewichtsverschiebung in umgekehrter Richtung. Das anorganische Phosphat steigt so lange an, bis die Dephosphorylierungsgeschwindigkeit wieder auf ihren alten Betrag vor der Belichtungsperiode abgesunken ist. Das vermehrte anorganische Phosphat bewirkt aber eine Steigerung der Atmung und damit auch der Phosphorylierung, die den Phosphatüberschuß rasch wieder ausgleicht und das ursprüngliche Gleichgewicht erneut herstellt.

Sowohl die Versuche von Emerson und Lewis³¹ und von van der Pauw²⁵ als auch die eigenen Beobachtungen legen die Annahme einer erhöhten Atmungsrate im Anschluß an eine Belichtungsperiode nahe. Auf Grund der Phosphatkurven wäre das Maximum der Atmungssteigerung etwa 2—3 Min. nach der Verdunklung zu erwarten, da in diesem Zeitraum der Überschuß an anorganischem Phosphat wieder eingebaut wird. Wie bereits erwähnt, gestattet aber die Trägheit der manometrischen Messung keine

³³ R. van der Veen, *Physiol. Plantarum* **2**, 217 [1949].

³⁴ S. Ruben, M. Randall, M. D. Kamen u. J. L. Hyde, *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 877 [1941].

genaue Ablesung in dieser Zeit. Da aber in den zweiten 5 Min. die höchsten Atmungsraten gemessen werden, darf man annehmen, daß sie tatsächlich schon in der 3. Min. erreicht werden. In diesem Zusammenhang kann noch auf eine neuere Arbeit von van der Veen³³ hingewiesen werden, der mit dem Gaswechselschreiber in der ersten Minute nach der Verdunklung einen starken CO₂-Ausstoß fand.

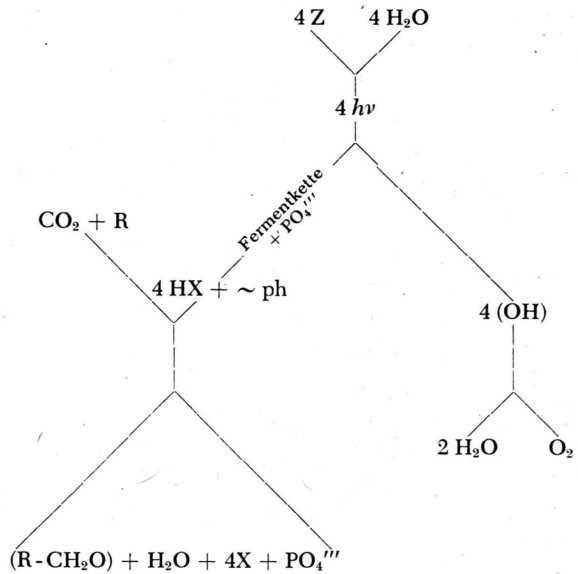
Zunächst sei nun die Frage diskutiert, wie es innerhalb der photochemischen Reaktion zur Bildung \sim ph kommen kann. Seit den Arbeiten von Ruben und Mitarbeitern³⁴ mit einem Sauerstoffisotop und der Entdeckung der photochemischen Aktivität isolierter Chloroplasten durch Hill und Warburg³⁵ ist es nicht mehr zweifelhaft, daß mit Hilfe von Lichtenergie der Wasserstoff des Wassers von seinem niederen Potential auf ein höheres gehoben wird, dadurch auf einen H-Acceptor übertreten kann und der Sauerstoff des Wassers als Assimilationssauerstoff entweicht. Da ein Mol Quanten der gerade noch photochemisch wirksamen Wellenlänge einen Energieinhalt von etwa 43 Kcal besitzt, könnte der Wasserstoff vom Potential des Wassers ($E = 0,81$ V) zunächst auf das hohe Potential $E = -1,0$ V* eines hypothetischen Redoxsystems HZ \rightleftharpoons Z gehoben werden und von hier aus über eine Redox-Ferment-Kette auf einen H-Acceptor mit einem Potential wie etwa dem der Codehydrase ($E = -0,28$ V) übergehen. Die dabei freiwerdende Energie könnte nach dem Typ der Atmungsketten-Phosphorylierung in \sim ph gespeichert werden. Lynen und Holzer⁶ haben für den Übergang des Wasserstoffs von der Essigsäure zum

³⁵ R. Hill, *Proc. Roy. Soc. [London]* **B 127**, 192 [1939]; O. Warburg, *Schwermetalle als Wirkgruppen von Fermenten*, Berlin 1948.

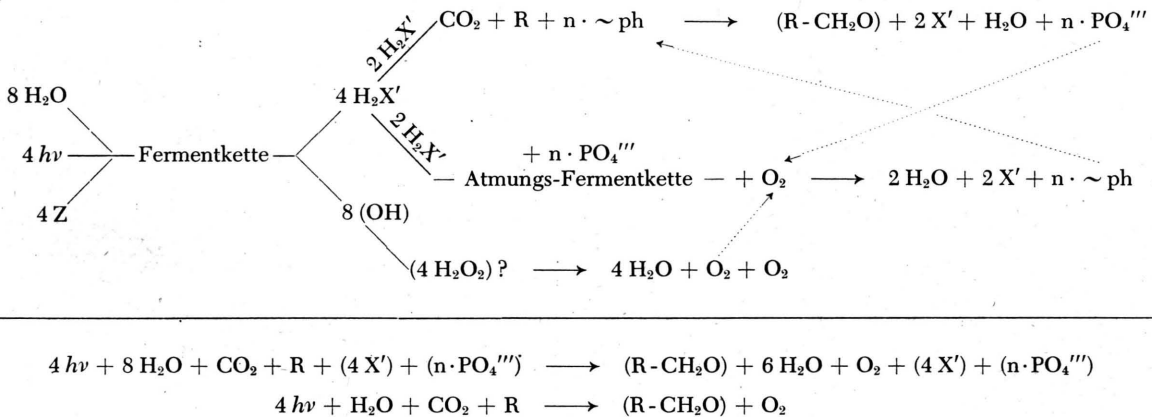
* Berechnet nach $\Delta F = \Delta E \cdot n \cdot F_k \cdot n = 1$; $\Delta F = 43$ kcal. $F_k =$ Faradaysche Konstante = 23,07.

gerade ausreichen, um 2 H auf dieses Potential zu heben, und andererseits würde bei der Rekombination eines Teils des H mit O₂ genügend Energie frei, um ~ ph zu bilden, dessen 10—12 kcal ebenfalls gerade ausreichen, um die 9,5 kcal zu liefern, die notwendig sind, um vom Potential des gelben Ferments aus die Carboxylgruppe z. B. der Essigsäure zu reduzieren. Eine gewisse Wahrscheinlichkeit erhält diese Vorstellung, wenn man die Versuche Gaffrons³⁷ mit H₂-adaptierten *Scenedesmus*-Stämmen betrachtet.

Welche der beiden besprochenen Möglichkeiten, die Hebung des Wasserstoffs auf ein sehr hohes Potential und anschließendem Übergang auf ein mittleres Potential unter Bildung von ~ ph oder die Übertragung der doppelten Anzahl H-Atome auf einen Acceptor niederen Potentials mit nachfolgender Rekombination eines Teiles derselben mit O₂ unter Bildung von ~ ph verwirklicht ist, kann vielleicht durch künftige Untersuchungen der Redoxverhältnisse einzelner Überträgersysteme und ihrer Abhängigkeit vom Licht-Dunkel-Wechsel entschieden werden. Daß beide Reaktionsabläufe energetisch



Schema I. Z bedeutet das erste, X das letzte Glied (etwa mit dem Potential der Codehydrase), einer Redox-Fermentkette, mit deren Vermittlung der Wasserstofftransport und die Phosphatbindung erfolgt.



Schema II. Abweichend von Schema I bedeutet X' einen H-Acceptor mit dem Potential eines Flavinfermentes.

möglich sind, zeigen die Tab. 4a und 4b. Die bei den einzelnen Teilschritten auftretenden hohen Energieausbeuten erscheinen nicht unwahrscheinlich, wenn man die beim Kohlenhydratabbau bekannten Daten damit vergleicht.

Im Prinzip einfacher, aber im einzelnen vielfältiger sind die Möglichkeiten der mit der Photosynthese verknüpften Dephosphorylierungen. Zunächst kann, wie es in den Schemata I und II bereits angedeutet ist, das ~ ph zu Carboxylierungen und anschließenden

der Hydrierung von Zwischenprodukten des Kohlenhydratabbaues verwendet werden. Entsprechende Beispiele sind von Pirson¹⁵ und Paech³⁸ zusammengestellt worden. Diese CO₂-Assimilation verbraucht unter normalen Verhältnissen sicherlich den größten Teil des durch die Photosynthese gebildeten ~ ph und Wasserstoffs und vielfach werden Kohlenhydrate als einzige „Assimilate“ angesehen. Es erscheint aber heute als sehr wahrscheinlich, daß die Nitratreduktion unmittelbar mit Hilfe der primären

³⁷ H. Gaffron, J. gen. Physiol. 26, 241 [1942].

³⁸ K. Paech, Fortschr. Bot. 12, 287 [1949].

photochemischen Produkte HX und \sim ph erfolgt. Besonders überzeugend konnte Burström³⁹ zeigen, daß in jungen Weizenblättern eine Nitratassimilation auf Kosten der CO₂-Assimilation stattfindet. Geßner⁴⁰ fand eine deutliche Abhängigkeit der Nitrat-aufnahme von der Belichtung bei Blättern submerser Pflanzen, und Burgeff⁴¹ beobachtete, daß bei rein saprophytischen Orchideen nur NH₄⁺, bei grünen dagegen auch Nitrat verwendet werden kann.

Die Beteiligung von Phosphorylierungsprozessen an Aminierungen und am Eiweißaufbau darf als gesichert angesehen werden⁴². Beim Aufbau von Aminosäuren aus niederen Carbonsäuren, wie in dem bekannten Beispiel Bernsteinsäure \rightarrow Glutaminsäure, kann also nicht nur die Carboxylierung und Hydrierung der Bernsteinsäure zur α -Ketoglutarinsäure, sondern auch die Reduktion des Nitrats zur Aminogruppe und deren Einbau ein Glied der Photosynthese sein. Es ergäbe sich damit gewissermaßen ein „doppeltes Assimilat“.

Von hier aus führt nur ein kleiner Gedankensprung zur Einbeziehung der Sulfatreduktion in die Photosynthese. Die starke Wirkung von Zusätzen schwefelhaltiger Aminosäuren zu den Nährböden heterotropher Organismen ist ebenso bekannt wie der fördernde Einfluß derselben auf pflanzliche Gewebekulturen⁴³. Daß für eine im Licht geförderte Steigerung der Sulfatreduktion keine entsprechenden experimentellen Untersuchungen vorliegen, wie dies bei der Nitratreduktion der Fall ist, liegt wohl an methodischen Schwierigkeiten. Hier könnte nur die „tracer-Methode“ unter Verwendung eines Schwefelisotops Aufklärung bringen.

In Weiterführung dieser Gedankengänge kann auch die Frage zur Diskussion gestellt werden, ob nicht auch die Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels und darunter besonders die „aktivierte Essigsäure“ durch die Photoprodukte HX und \sim ph zu energiereicheren Verbindungen hydriert und kondensiert werden können. Die Frage nach der Entstehung der sekundären Pflanzenstoffe ist seit langem ein offenes Problem der Pflanzenphysiologie. Es erscheint nicht abwegig, besonders für die Bildung der Terpene einen engeren Zusammenhang mit der Photosynthese zu suchen. Ist es doch, wie auch

Paech⁴⁴ ausführt, eine auffällige Tatsache, daß diese Stoffgruppe auf die grünen Pflanzen beschränkt ist und den Saprophyten völlig fehlt. Eine Ausnahme bilden nur die Agaricaceen unter den Pilzen, wo kautschukähnliche Verbindungen vorkommen. Weiterhin ist anzuführen, daß die terpenreichen Pflanzen, mit Ausnahme der Koniferen, auf die Tropen und Subtropen konzentriert sind und auch dort extrem besonnene Standorte vorziehen. Bei der durch Wasser und CO₂-Mangel (Spaltöffnungsschluß!) bedingten Depression der CO₂-Assimilation, gerade während des stärksten Lichtgenusses, ist eine Umleitung der primären Photoprodukte auf den Umbau von Kohlenhydraten in stark reduzierte Verbindungen leicht vorstellbar.

Für die Bildung höherer Fettsäuren ist ein engerer Zusammenhang mit der Photosynthese schon früher diskutiert worden; und neuere Arbeiten, bei denen außerordentliche Fettansammlungen bei *Chlorella* erreicht wurden (vgl. Pirson 1949¹⁵), können durchaus in diesem Sinne verwertet werden.

Sehr vielfältig sind die Beziehungen zwischen Belichtung und Farbstoffbildung⁴⁴. Inwieweit auch hier energiezehrende Hydrierungen, die durch die Photoprodukte gefördert werden, eine Rolle spielen, wäre zu überlegen.

Zahlreiche Beispiele der „formativen Lichtwirkung“ bietet die Entwicklungsphysiologie⁴⁵. Ein großer Teil der bei Lichtmangel auftretenden Ausfallerscheinungen (Etiollementserscheinungen, geringere Vitalität der chlorophyllfreien Stellen panaschierter Blätter) läßt sich auf die zu geringe Bildung verschiedener Wachstumsstoffe und Aminosäuren (vgl. die obigen Bemerkungen über Nitrat- und Sulfatreduktion) zurückführen. Auch die Blühormone und das Problem der Lang- und Kurztagpflanzen, bei dem seit langem Verschiebungen zwischen assimilatorischem und dissimilatorischem Stoffwechsel als Ursachen diskutiert werden, gehören in diesen Zusammenhang.

Die Frage, warum alle diese Stoffe bei ausreichender Kohlenhydratversorgung nicht auch im Dunkeln gebildet werden, nachdem HX und \sim ph auch im dissimilatorischen Stoffwechsel fortwährend gebildet werden, ist mit dem Hinweis zu beantworten, daß zwar die Reaktionspartner weitgehend gleich (Unter-

³⁹ H. Burström, Naturwiss. 30, 645 [1942]; Ann. Landw. Hochschule Schweden 11, 1 [1943].

⁴⁰ F. Geßner, Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr. 43, 211 [1943].

⁴¹ H. Burgeff, Die Samenkeimung der Orchideen, Jena 1936.

⁴² A. Gulick, Adv. Enzymology 4, 1 [1943].

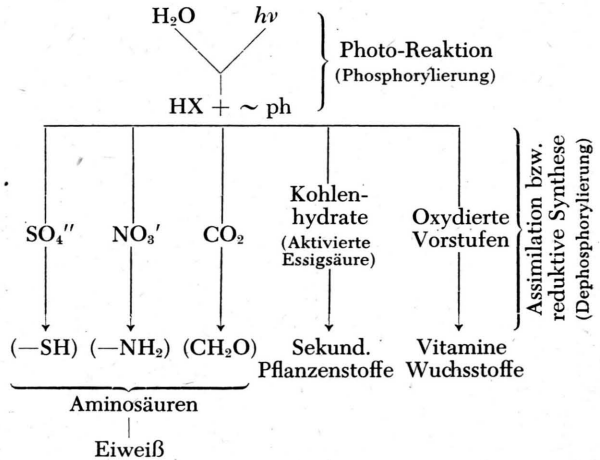
⁴³ R. Gautheret, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 208, 1340 [1939].

⁴⁴ K. Paech, Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1950.

⁴⁵ E. Bünning, Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanzen, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1948.

schiede bestehen vermutlich in der Art der H-Acceptoren und besonders ihren Potentialen), die Gleichgewichte zwischen denselben aber in Licht und Dunkelheit verschoben sind. So wird bei der aeroben Atmung ein großer Teil des $\sim ph$ erst unter Verbrauch von Wasserstoff höheren Potentials durch die Atmungsketten-Phosphorylierung gebildet, und damit dürfte der Wasserstoff einen Minimumfaktor darstellen. Wird durch Sauerstoffentzug oder Atmungsgifte der Kohlenhydratabbau in Richtung auf die Gärung verschoben, so steht der Wasserstoff in größerem Umfang für Hydrierungsprozesse zur Verfügung, und die unter diesen Bedingungen auftretenden Wachstumsbeeinflussungen⁴⁶ stehen vielleicht damit im Zusammenhang. Grundsätzlich sind die Synthesemöglichkeiten grüner Pflanzen in Licht und Dunkelheit gleich, aber viele Reaktionen laufen bei dem im Dunkeln vorliegenden Gleichgewicht nur sehr langsam oder vielleicht gar nicht ab und können nur durch zusätzliche Energiezufuhr, in unserem besprochenen Fall durch Lichtabsorption im Chlorophyll und die damit verbundene Gleichgewichtsverschiebung so gefördert werden, daß die entsprechenden Endprodukte in den für die normale Entwicklung der Pflanze notwendigen Mengenverhältnissen entstehen.

Auf Grund dieser Überlegungen läßt sich für den Gesamtprozeß der Photosynthese unter Weglassen aller Nebenreaktionen die im Schema III dargestellte Gliederung durchführen. Dabei ist die einleitende photochemische Reaktion mit Phosphorylierung, die daran anschließende Assimilation und reduktive Synthese verschiedener Stoffe mit Dephosphorylierung verbunden. Der Ersatz der Lichtenergie durch chemische Energie, wie sie aus der Oxydation von Schwefel oder Eisen gewonnen wird, verwandelt dieses Bild der



Schema III. Der Gesamtprozeß der Photosynthese gliedert sich in die „Photo-Reaktion“ (Absorption eines Lichtquants bis zur Bildung von HX und $\sim ph$) und die Assimilation (Reduktion und Einbau von CO_2 , NO_3' , SO_4'') und „reduktive Synthese“ (Umbau von Kohlenhydraten und sauerstoffreichen Vorstufen, in sekund. Pflanzenstoffe und Wuchsstoffe).

Photosynthese leicht in das der entsprechenden Chemosynthese. Ebenso klar sind durch die zentrale Lage der „Zwischenprodukte“ HX und $\sim ph$ die Querverbindungen dieses Photosyntheschemas zum Atmungsstoffwechsel, der im Prinzip, nicht in allen seinen Einzelheiten, eine Umkehr der CO_2 -Assimilation darstellt. Reversibel ist auch die reduktive Synthese eines Teils der sek. Pflanzenstoffe (Fette!), während Sulfat- und Nitratassimilation in der Pflanze irreversibel verlaufen.

Dieses Bild erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, aber es soll versuchen, die große Zahl neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Stoffwechselphysiologie in einheitlicher Form miteinander zu verknüpfen und vor allem die Bedeutung der Phosphorsäure auch für die Photosynthese darzustellen.

⁴⁶ W. Ruhland u. K. Ramshorn, *Planta* **28**, 471 [1938]; O. Kandler, *Z. Naturforschg.* **5b**, 203 [1950].