

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

66. Jahrgang · Nr. 3 · Seite 65–92 · 7. Februar 1954

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

Chemie und Energetik der pflanzlichen Photosynthese

Von Priv.-Doz. Dr. H. HOLZER*)

Aus der Biochemischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität München
und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg

Der Kohlenhydratabbau im Zuge der Atmung weist bei tierischen und pflanzlichen Geweben keine prinzipiellen Unterschiede auf. Sehr wahrscheinlich besteht die Photosynthese der grünen Pflanzen im wesentlichen in einer Umkehrung der Atmungsvorgänge. Der notwendige Wasserstoff in Form hydrierter Cofermente und energiereiches Phosphat werden durch die Photolyse des Wassers und dadurch mögliche Folgereaktionen zur Verfügung gestellt. Die Quantenausbeute bei der Photosynthese und der von O. Warburg entdeckte 1-Quanteneffekt werden auf der Basis dieser Vorstellungen diskutiert.

Die enorme Mannigfaltigkeit der heute lebenden Tier- und Pflanzenformen läßt es einem unbefangenen Beobachter wahrscheinlich erscheinen, daß auch das chemische Geschehen in den verschiedenen Lebewesen eine solche Mannigfaltigkeit aufweist. Heute wissen wir, daß dies für die Tierwelt und wahrscheinlich auch für die Pflanzenwelt nicht zutrifft. Die wichtigsten Inhaltsstoffe der belebten Materie, wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine, sowie die Reaktionsfolgen, die zu ihrem Auf- und Abbau und zur gegenseitigen Umwandlung führen, sind für die Mehrzahl der bisher untersuchten Lebewesen prinzipiell ähnlich. So kommt es, daß der Biochemiker bei der Untersuchung einer Zwischenstufe des Stoffwechsels in vielen Fällen, ohne wesentliche Unterschiede erwarten zu müssen, den gesuchten Katalysator aus so verschiedenen Ausgangsmaterialien wie Pferdeleber, Taubenbrustmuskel, *Aspergillus niger* oder Spinatblättern anreichern kann. Zwar sind graduelle Unterschiede zweifellos vorhanden — hier sei an die verschiedenen prosthetischen Gruppen und Molekulargewichte der Aldolase und Milchsäuredehydrolase aus Kaninchenmuskel einerseits und Hefe andererseits erinnert — aber die chemischen Reaktionsfolgen, die beispielsweise beim Kohlenhydratabbau in Säugetieren und Hefe eingeschlagen werden, sind weitgehend identisch. Betrachtet man den entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang der Lebewelt, so wird dieser Befund verständlich: die bewährten chemischen Reaktionsfolgen wurden bei der Entwicklung der verschiedenen Organismenarten beibehalten und bei der Entstehung höherer Arten lediglich durch neue Seitenwege und insbesondere durch übergeordnete Regulationssysteme erweitert. In den ersten Stadien der Entstehung des Lebens „experimentierte“ die Natur, um die wirkungsvollsten Reaktionswege zu finden. Damals wurden verschiedenste Möglichkeiten realisiert, und eventuell sind die heute lebenden Bakterien, die oft recht beträchtliche Stoffwechselunterschiede aufweisen, Überbleibsel jenes frühen Stadiums der Entwicklung des Lebens auf der Erde.

Bei dieser Sachlage erscheint es zweckmäßig, zum Problem der pflanzlichen Photosynthese erst einen kurzen Blick auf das für Säugetiere und verschiedene Mikro-

organismen nachgewiesene Stoffwechselschema zu werfen, dann zu prüfen, inwiefern diese Befunde für Pflanzen Gültigkeit besitzen, und schließlich die durch Lichtenergie ermöglichten synthetischen Prozesse mit in die Betrachtungen einzubeziehen. Hierbei interessiert besonders der Kohlenhydratstoffwechsel, da Kohlenhydrat in Form von Stärke das quantitativ vorherrschende Produkt der Photosynthese ist.

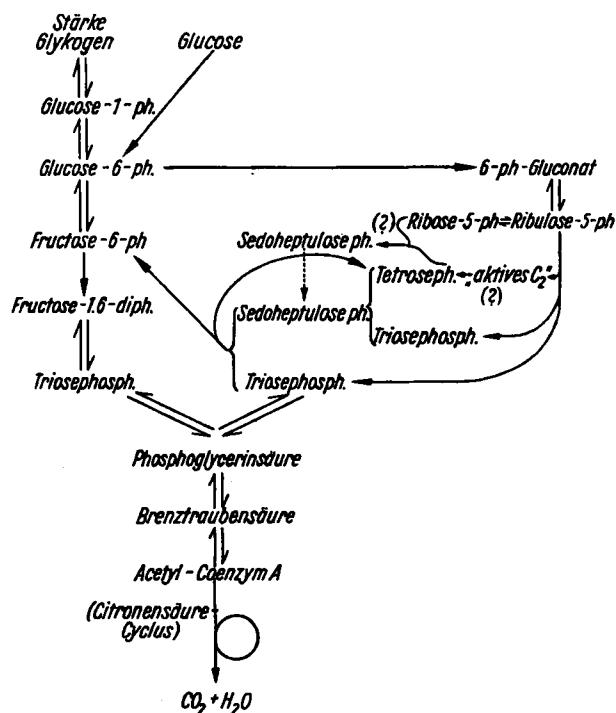


Bild 1
Vereinfachtes Schema des Kohlenhydratabbaus

Mit dem Mechanismus des Kohlenhydratabbaues in tierischen Geweben hat sich die Biochemie schon früh beschäftigt; heute dürfen wir sagen, daß die beteiligten Reaktionsfolgen und Katalysatoren recht gut bekannt sind. Eine vereinfachte Darstellung ist in Bild 1 wiedergegeben. Zwar zeichnet sich gerade in den letzten Jahren

*) Herrn Prof. Dr. K. Thomas ergebenst zum 70. Geburtstag gewidmet.

ein vom klassischen *Embden-Meyerhof*-Schema abweichen-
der Seitenweg ab, aber auch hier wird man binnen kurzem
mit einer endgültigen Klärung der Reaktionswege und mit
Angaben über die quantitative Bedeutung dieser Reak-
tionsfolge rechnen dürfen. In Bild 1 ist der über Heptosen
und Pentosen verlaufende Seitenweg eingezeichnet, ob-
wohl einige Reaktionen noch nicht gesichert sind.

Kohlenhydratabbau in grünen Pflanzen

Besonders im letzten Jahrzehnt wurden die an tierischen Geweben gewonnenen Erkenntnisse auf den Stoffwechsel der grünen Pflanzen übertragen. Man kann die hierbei gewonnenen Befunde dahingehend zusammenfassen, daß sich der Kohlenhydratabbau in Pflanzengeweben aller Art, auch in grünen Einzellern, nicht prinzipiell von dem der tierischen Gewebe unterscheidet¹⁾. Sowohl die Fermente des *Embden-Meyerhof*-Schemas wie einzelne Fermente des insbes. den Untersuchungen von *Horecker* zu dankenden Abbauweges über Pentosen und Heptosen sind in den verschiedensten Pflanzengeweben gefunden und teilweise weitgehend angereichert und charakterisiert worden. Als Beispiel sind in Tabelle 1 einige Fermente aus der einzelligen Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* aufgeführt.

Enzym	Substrat	Fermentquelle	Testmethode	Aktivität (30°) (Q _{O₂} , umger. auf Glucose-Oxydat./1 mg Trockengew.)
Hexokinase	Glucose + ATP	mit flüss. Luft plasmoly- sierte Zellen	Best. des 7 min- Phosphates	6
Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-dehydrase	<i>Embden-Ester</i> + ATP	Aceton-Pulverextrakt	Thunberg- methode	64
			Trioseph. nach Sibley u. Lehninger	40
Aldolase u. Triosephosphat-dehydrase	Fructosediphosphat	Acetonpulverextrakt	Thunberg- Methode	9
			Trioseph. nach Sibley u. Lehninger	68
Aldolase	Fructosediphosphat	Aceton-Pulverextrakt	Trioseph. mit HCN abgefangen	16

Dunkelatmung lebender *Chlorella*-Zellen (endogen) Q_{O₂} = 10–20
Dunkelatmung lebender *Chlorella*-Zellen (mit Glucose) Q_{O₂} = 30–50.

Tabelle 1
Einige Fermente des *Embden-Meyerhof*-Schemas in *Chlorella*²⁾

Wir haben uns nicht damit begnügt, die einzelnen Fermentaktivitäten nachzuweisen, sondern auch geprüft, ob diese Fermente beim Kohlenhydratabbau in der intakten Zelle in Funktion treten. Dazu wurde die bei der Untersuchung tierischer Gewebe und Extrakte entwickelte Methode der „spezifischen Hemmung“ angewandt und atmende *Chlorella*-Zellen mit geringen Konzentrationen Jodacetat vergiftet. Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Experimente hatten ergeben, daß Jodessigsäure die Triosephosphat-dehydrase der *Chlorella*-Extrakte genau so inaktiviert, wie dies bei tierischen Extrakten und Hefe der Fall ist. Man müßte demnach als Folge der Vergiftung einen Aufstau des Substrates der Triosephosphat-Dehydrase (3-Phosphoglycerinaldehyd) in den intakten

¹⁾ Zusammenfassung siehe z. B. James Bonner: „Plant Biochemistry“, New York [1950].

²⁾ H. Holzer u. E. Holzer, Chem. Ber. 85, 655 [1952].

Chlorella-Zellen erwarten. Nachdem 3-Phosphoglycerinaldehyd im Gleichgewicht mit Fructosediphosphat steht (katalysiert durch Isomerase und Aldolase), muß sich auch Fructosediphosphat aufstauen. Wir haben diese Substanz mit kristallisierter Muskelaldolase bestimmt und einen solchen Stau tatsächlich nachgewiesen (Tabelle 2). Dieser Befund scheint uns ein starkes Argument für die Identität des einleitenden Kohlenhydratabbaues in Hefe und *Chlorella*.

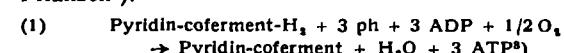
Bäckerhefe + Glucose + O ₂			
Zeit in min	10	20	
	μM Fructosediph./g feuchte Hefe		
Ohne JES	0,9	0,9	
Mit JES	0,9	2,0	
(In der 11. min JES zugesetzt)			

Chlorella + Glucose + O ₂			
Zeit in min	30	72	90
	μM Fructosediph./g Chlorella-Trockengewicht		
Ohne JES	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Mit JES	≤ 0,5	3,5	5,0
(In der 31. min JES zugesetzt)			

Tabelle 2
Fructosediphosphat-Aufstau bei Hefe und *Chlorella* nach Jodessigsäure-Einwirkung³⁾

Die aus der Triosephosphat-dehydrierung resultierende Phosphoglycerinsäure wird in Hefe und tierischen Geweben über verschiedene Zwischenstufen zu Brenztraubensäure und Acetyl-Coenzym A weiterverändert. Die durch Bindung am Coenzym A aktivierte Essigsäure kondensiert mit Oxalessigsäure zu Citronensäure und leitet so die völlige Oxydation über den Citronensäure-Cyclus ein. Besonders J. Bonner und seine Mitarbeiter haben die Fermente des Citronensäure-Cyclus in pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesen. Das Studium der beteiligten Fermente hat gezeigt, daß keine prinzipiellen Unterschiede zu tierischen Mitochondrien bestehen.

In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, daß die Konservierung der bei den Verbrennungsvorgängen frei werdenden Energie in „energiereichen Phosphat-Bindungen“ mit der Wasserstoff- bzw. Elektronenübertragung über das System der Atmungsfermente in den Mitochondrien gekoppelt ist. Dieser Mechanismus, dessen Bilanz in Formel (1) festgehalten ist, wurde von A. L. Lehninger⁴⁾ erstmalig mit aller Schärfe in tierischen Mitochondrien nachgewiesen. Inzwischen wurde diese sogenannte „Atmungsketten-phosphorylierung“ auch in Hefezellen demonstriert⁵⁾, und N. Zöllner hat im Laboratorium von Lynen vor kurzem gezeigt, daß die Atmungsketten-phosphorylierung auch in *Chlorella*-Zellen verifiziert ist⁶⁾. Zu demselben Ergebnis kamen Bonner und Mitarbeiter bei Untersuchungen an Mitochondrien höherer Pflanzen⁷⁾.



Es muß hier betont werden, daß Gleichung (1) keine obligate, stöchiometrische Reaktionsfolge wiedergibt. Je nach den Bedingungen, unter denen die mit der Atmung verknüpfte Phosphat-Bindung gemessen wird, kann der P/O-Quotient (gebundene

³⁾ Vortrag H. Holzer beim 2. Internationalen Kongreß für Biochemie in Paris, Sektion Photosynthese, Juli 1952.

⁴⁾ M. Friedkin u. A. L. Lehninger, J. biol. Chemistry 174, 757 [1948].

⁵⁾ F. Lynen u. H. Holzer, Liebigs Ann. Chem. 563, 213 [1949]; F. Lynen u. R. Koenigsberger, ebenda 573, 60 [1951].

⁶⁾ N. Zöllner, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 291, 157 [1952].

⁷⁾ J. Bonner, Arch. Biochemistry 42, 135 [1953].

⁸⁾ In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen gebraucht:
ph = anorganisches Phosphat, ADP = Adenosindiphosphat,
ATP = Adenosintriphosphat, DPN = Diphospho-pyridinucleotid (Codehydrase I),

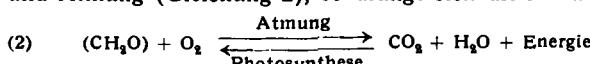
TPN = Triphospho-pyridinucleotid (Codehydrase II), DPN + TPN = „Pyridincofermente“.

Mole ph: aufgenommene Grammatome O) bei gleichbleibender Atmungsgröße kleinere Werte als 3 annehmen. Vermutlich ist P/O = 3 der optimale Grenzwert.

Wir können als Ergebnis der neueren Untersuchungen über den Pflanzenstoffwechsel zusammenfassend festhalten, daß eine weitgehende Identität der Kohlenhydrat-Oxidationsmechanismen in Pflanzen und Tieren vorliegt. Im folgenden Kapitel soll geprüft werden, welche Aspekte sich aus dieser Erkenntnis für den Mechanismus des photosynthetischen Kohlenhydrataufbaues ergeben.

Prinzipielle Reaktionstypen beim photosynthetischen Kohlenhydrat-Aufbau

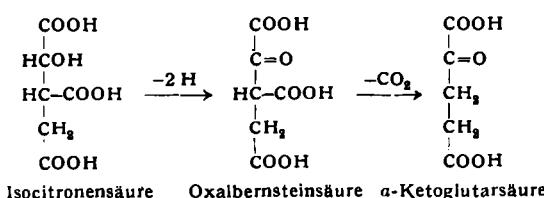
Betrachtet man die Bilanzgleichung von Photosynthese und Atmung (Gleichung 2), so drängt sich die Annahme



auf, daß nicht nur in der Bilanz, sondern auch bezüglich der beteiligten Reaktionstypen die Photosynthese eine Umkehrung der Atmungsvorgänge darstellt. Diesen Gedanken hat aufbauend auf die modernen Erkenntnisse über die Chemie des Kohlenhydratstoffwechsels und unterstützt mit belegenden Experimenten *S. Ochoa*⁹⁾ präzis formuliert. Es gilt heute als sehr wahrscheinlich, daß mit Ausnahme der eigentlichen Lichtreaktion die chemischen Reaktionstypen bei Atmung und Photosynthese prinzipiell dieselben sind, und es ist deshalb interessant und notwendig, den Gedankengang *Ochoas* unter Berücksichtigung unseres derzeitigen Wissens zu analysieren. Wir wollen hierzu die an der Atmung beteiligten Reaktionstypen unter dem Gesichtspunkt zusammenstellen, inwiefern eine Umkehrung dieser Reaktionen bei der Photosynthese eine Rolle spielen könnte.

Carboxylierungen

Lassen wir zunächst die direkte Hexose-Oxydation über das „Horecker-Schema“ außer acht, so verläuft die Entbindung von CO₂ beim oxydativen Kohlenhydratabbau bei drei Decarboxylierungsschritten, die pro Mol Hexose je zweimal ablaufen. Es handelt sich um die Decarboxylierung von Brenztraubensäure, α-Ketoglutarsäure und Oxalbernsteinsäure, wobei als Reaktionsprodukte „aktivierte Essigsäure“ (Acetyl-Coenzym A), „aktivierte Bernsteinsäure“ (Succinyl-Coenzym A) bzw. α-Ketoglutarsäure auftreten. Bei den beiden erstgenannten α-Ketosäuren ist die Decarboxylierung in einem Schritt mit einer Dehydrierung verbunden, wobei DPN als Wasserstoff-Acceptor dient, im Falle der Oxalbernsteinsäure geht der Decarboxylierung eine Dehydrierung voraus: Isocitronensäure wird mit TPN als Wasserstoffacceptor zu Oxalbernsteinsäure dehydriert.

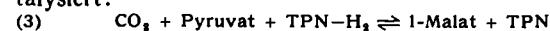


Man hat diese Decarboxylierungen lange Zeit für irreversibel gehalten, dann aber mit der Isotopenmethode bei verschiedenen Mikroorganismen und auch bei tierischen Geweben zeigen können, daß in geringem Ausmaße Fixierung von atmosphärischem CO₂ stattfindet¹⁰⁾. Heute

⁹⁾ *S. Ochoa, Currents in Biochemical Research*, New York, 1946, S. 165.

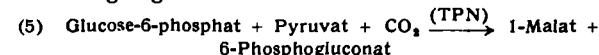
¹⁰⁾ Zusammenfassung siehe ¹¹⁾ u. ¹²⁾.

ist sichergestellt, daß die genannten Decarboxylierungen reversibel ablaufen¹¹⁾, wenn auch das Gleichgewicht so weit auf Seiten der CO₂-Abspaltung liegt, daß nur mit sehr empfindlichen Methoden ein CO₂-Einbau nachweisbar ist. Diese Schwierigkeit kann umgangen werden, wenn man das Decarboxylase-System mit einem Fermentsystem koppelt, welches das CO₂-Fixierungsprodukt wegängt. Hierzu können hydrierende Fermentsysteme dienen, wenn man dafür sorgt, daß ständig ein hohes Potential am Wasserstoff in Form von hydrierten Cofermenten zur Verfügung steht. *S. Ochoa* ist es gelungen, mit einem isolierten Ferment aus Taubenleber, das inzwischen auch in vielen anderen Organismen, insbesondere in höheren Pflanzen nachgewiesen wurde, eine solche „reduktive Carboxylierung“ im Reagenzglas zu demonstrieren. Es handelt sich um das „malic enzyme“, das folgende Reaktion katalysiert:



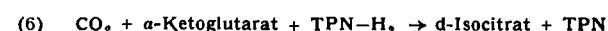
Zwar liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion ungünstig für die CO₂-Fixierung, die Reversibilität kann aber im optischen Test trotzdem direkt gezeigt werden. Koppelt man das System der Gleichung (3) mit einem TPN-H₂-liefernden System, z. B. Glucose-6-phosphat-Dehydrase

(4) Glucose-6-phosphat + TPN → 6-Phosphogluconat + TPN-H₂, so erhält man folgende Bilanzreaktion, deren Gleichgewicht völlig auf der rechten Seite, also zu Gunsten der CO₂-Fixierung liegt:



Diese Verschiebung der Gleichgewichtslage wird zahlenmäßig fassbar, wenn man berücksichtigt, daß die freie Energie einer Reaktion mit der Gleichgewichtskonstanten durch folgende Beziehung verknüpft ist: ΔF = RT·lnK. Reaktion (3) ist zwar endergon (Energie verbrauchend; nicht freiwillig verlaufend), aber Reaktion (4) ist so stark exergon (Energie freisetzend; freiwillig verlaufend), daß die Bilanzreaktion ebenfalls exergon wird.

Ganz analog konnte *Ochoa* mit dem TPN-H₂-liefernden System (4) die reduktive Carboxylierung von α-Ketoglutarat zu d-Isocitrat erzwingen:

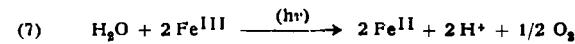


Auch das an dieser reversiblen Carboxylierung beteiligte Fermentsystem wurde in verschiedensten tierischen Geweben und in Pflanzengeweben nachgewiesen.

Damit ist sichergestellt, daß Decarboxylierungsprozesse prinzipiell reversibel verlaufen können, wenn nur genügend Wasserstoff in Form von hydrierten Pyridin-cofermenten zur Verfügung steht, um die primären Fixierungsprodukte abzufangen. Dieser Wasserstoff könnte bei der Photosynthese durch Wasserzerlegung mit Hilfe von Lichtenergie geliefert werden, eine Möglichkeit, die im nächsten Abschnitt betrachtet werden soll.

Hydrierungen

R. Hill¹²⁾ verdanken wir die Erkenntnis, daß die primäre Lichtreaktion mit Wasser in einer Zersetzung des Wassers besteht, wobei der in der Bilanzreaktion der Photosynthese auftretende Sauerstoff freigesetzt wird und zu Reduktionen befähigter Wasserstoff entsteht. So können Eisen(III)-Ionen unter Ausnutzung von Lichtenergie zu Eisen(II)-Ionen reduziert werden:

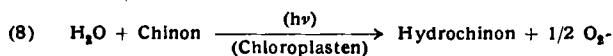


¹¹⁾ *S. Ochoa u. W. Vishniac, Science 115, 297 [1952].*

¹²⁾ *R. Hill, Nature [London] 139, 881 [1937] u. Proc. Roy. Soc. London B 127, 192 [1939].*

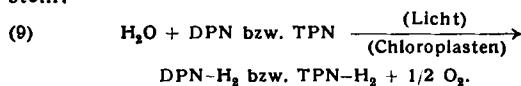
Sehr wahrscheinlich ist die von *Hill* beschriebene licht-abhängige Wasserzerlegung die einzige Lichtreaktion im Zuge der Photosynthese¹³⁾. Ist der zu Hydrierungen befähigte Wasserstoff unter Ausnützung der Lichtenergie zur Verfügung gestellt, so genügt der „Wasserstoff-Druck“ als einzige und ausreichende Energiequelle für alle weiteren enzymatisch katalysierten „Dunkelprozesse“, die zum Aufbau der Zellsubstanzen führen. Darauf soll im folgenden näher eingegangen werden.

Warburg und *Lüttgens*¹⁴⁾ haben die *Hill*-Reaktion mit Chloroplasten bzw. Grana aus Spinatblättern und Chinon als Wasserstoff-Acceptor eingehend studiert:

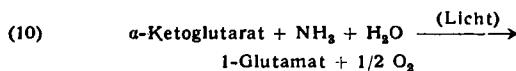


Damit war erstmalig eine organische Substanz als Wasserstoff-Acceptor gefunden. Inzwischen wurde eine Reihe weiterer organischer Substanzen, insbes. Redoxfarbstoffe, in die *Hill*-Reaktion als Wasserstoff-Acceptor eingeführt.

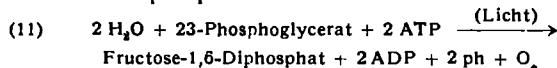
Die Frage, ob auch die für reduktive Carboxylierungen notwendigen Pyridin-cofermente im Zuge der *Hill*-Reaktion reduziert werden, konnte vor kurzem beantwortet werden. Bei Belichtung von Chloroplasten aus Spinatblättern gelang es *Ochoa* und *Vishniac*¹⁵⁾, zugesetztes DPN und TPN zu reduzieren und damit bei den CO₂-Fixierungsreaktionen (3) und (6) das Glucose-6-phosphat-Dehydrase-System zu ersetzen durch das Wasserstoff liefernde System:



Auch andere Reaktionen, z. B. die reduktive Aminierung von α-Ketoglutaräure zu 1-Glutaminsäure



oder die reduktive Überführung von Phosphoglycerinsäure in Fructosediphosphat



gelingen im Reagenzglas mit dem Chloroplasten-DPN-System¹¹⁾. Hierbei wurden jeweils die spezifischen isolierten oder angereicherten Fermente (teils aus tierischen Geweben, teils aus pflanzlichen Geweben) zugesetzt.

Reaktionsfolge (11) ist in zweierlei Hinsicht von besonderem Interesse: 1.) gelingt hier der Kohlenhydrat-Aufbau aus einer Substanz, die heute als primäres CO₂-Fixierungsprodukt anerkannt ist, und 2.) zeigt sie, daß zur Erzeugung der Umkehrung von Dissimulationsvorgängen nicht nur zu Hydrierungen befähigter Wasserstoff, sondern auch energiereiches Phosphat in Form von ATP notwendig ist. Auch ATP muß demnach bei der Photosynthese unter Ausnützung des Lichtes als allein zur Verfügung stehende Energiequelle ständig regeneriert werden.

Erzeugung energiereicher Phosphat-Bindungen

ATP ist nicht nur zur Umkehrung der Triosephosphat-Dehydrierung, sondern auch für viele andere synthetische Reaktionen notwendig. Deshalb wurde eine Beteiligung von energiereichem Phosphat an der Photosynthese schon

von verschiedensten Seiten postuliert. Einwandfreie Beweise für eine Beteiligung von Phosphorylierungsvorgängen am Photosyntheseprozess bei *Chlorella* erbrachten Versuche von *Kandler*¹⁶⁾, die charakteristische Konzentrationsunterschiede des anorganischen Phosphates beim Hell-Dunkel-Wechsel demonstrierten. Überlegungen von *Lynen*¹⁷⁾ folgend, müssen solche Niveaunterschiede des anorganischen Phosphates als Ausdruck eines veränderten stationären Zusammenwirkens von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozessen gedeutet werden. Vor kurzem fand *Strehler*¹⁸⁾ mit dem Licht erzeugenden Enzymsystem aus Glühwürmchen, das sich zu einem sehr empfindlichen ATP-Test eignet, eine auf das Mehrfache erhöhte stationäre ATP-Konzentration in belichteten *Chlorella*-Zellen gegenüber dunkel gehaltenen Zellen. Die Experimente von *Kandler* und *Strehler* sprechen dafür, daß tatsächlich neben dem erhöhten „Wasserstoff-Druck“ bei der Photosynthese auch ein erhöhter „ATP-Druck“ vorliegt.

Bei dieser Situation erhebt sich die Frage, mit welchem Mechanismus die Lichtenergie bei grünen Pflanzen zum Aufbau von energiereichen Phosphat-Bindungen ausgenutzt wird. Aufbauend auf die Versuche von *Ochoa*, wonach DPN und TPN am Licht reduziert werden, konnten wir einen Mechanismus der ATP-Erzeugung in *Chlorella* wahrscheinlich machen, der seine Energie aus den hydrierten Pyridin-cofermenten bezieht. Es handelt sich um die bereits genannte Atmungsketten-phosphorylierung (Gleichung (1)). Vermutlich wird nur ein Teil der am Licht reduzierten Cofermente zur Hydrierung von CO₂-Fixierungsprodukten verbraucht, der Rest wird von Sauerstoff über die Fermente der Atmungskette reoxydiert und stellt dabei ATP zur Verfügung. Überträgt man diese Anschauung auf die in Gleichung (11) enthaltene Reduktion von Phosphoglycerinsäure, so ergibt sich der in Bild 2 wiedergegebene Zusammenhang.

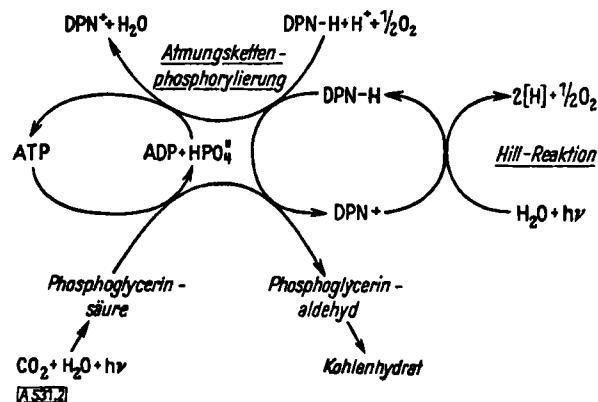


Bild 2
Umkehrung der Triosephosphatdehydrierung bei der Photosynthese¹⁹⁾

Besteht die Annahme zu Recht, daß das für die Photosynthese notwendige energiereiche Phosphat durch Atmungsketten-phosphorylierung geliefert wird, so müßten Substanzen, die die Atmungsketten-phosphorylierung entkoppeln, d. h. die Synthese von energiereichen Phosphatbindungen verhindern, auch die Photosynthese hemmen. Daß eine solche Substanz, z. B. 2,4-Dinitrophenol spezifisch nur durch Entkopplung der Atmungsketten-phosphorylierung wirksam ist, müßte sich dann dadurch kundtun, daß die Größe der Dunkelatmung unbeeinflußt bleibt, wie

¹³⁾ Siehe z. B. A. S. Holt u. C. S. French in „Photosynthesis in Plants“, Ames, Iowa, 1949, S. 278.

¹⁴⁾ O. Warburg u. W. Lüttgens, siehe O. Warburg, „Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten“, Berlin 1946, S. 170.

¹⁵⁾ S. Ochoa u. W. Vishniac, Nature [London] 167, 946 [1951]; D. J. Arnon, ebenda 167, 1008 [1951]; L. J. Tolmach, ebenda 167, 946 [1951].

¹⁶⁾ O. Kandler, Z. Naturf. 5b, 423 [1950]; siehe hierzu auch¹⁸⁾ und W. Simonis u. K. H. Grube, ebenda 7b, 194 [1952] sowie K. H. Grube, Planta 42, 279 [1953].

¹⁷⁾ F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 546, 120 [1941] und Naturwiss. 30, 398 [1942].

¹⁸⁾ B. L. Strehler u. J. R. Totter, Arch. Biochemistry 40, 39 [1952].

¹⁹⁾ H. Holzer, Z. Naturf. 6b, 424 [1951].

dies bei der Einwirkung geringer Dinitrophenol-Konzentrationen auf tierische Gewebe oder Mitochondrien beobachtet wird. In Bild 3 ist ein manometrischer Versuch wiedergegeben, der die spezifische Hemmung der Photosynthese

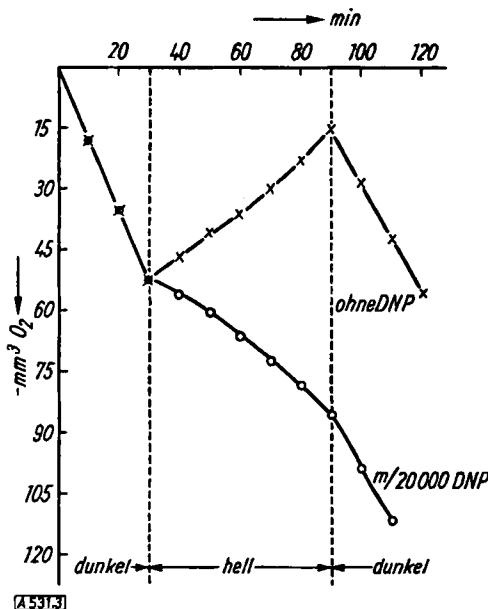
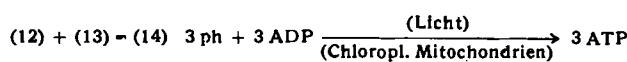
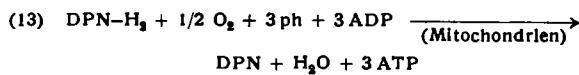
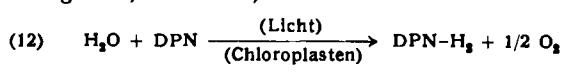


Bild 3

Spezifische Hemmung der Photosynthese durch 2,4-Dinitrophenol bei Chlorella^{19, 20}). Pro Gefäß 20 mg Trockengewicht; Citratpuffer pH 5,4; T = 25 °C; im Einsatz Pardee-Puffer entsprechend 1 % CO₂ in der Gasphase

bei Chlorella durch sehr geringe Dinitrophenol-Konzentrationen beweist²⁰). 1952 konnte Ochoa²¹) einen direkten Beweis für die lichtabhängige Erzeugung von ATP mit Hilfe der Atmungsketten-phosphorylierung erbringen: inkubiert man Chloroplasten und Mitochondrien mit DPN, anorganischem Phosphat und ADP, so findet bei Belichtung eine ATP-Synthetase statt, die nur als Folge der Atmungskettenphosphorylierung erklärt werden kann (Gleichungen 12, 13 und 14).



Hier muß angefügt werden, daß heute prinzipielle Bedenken bestehen, ob tatsächlich Pyridin-cofermente die primären Wasserstoff-Acceptor bei der Lichtreaktion sind: 1.) ist der Wirkungsgrad der mit Chloroplasten ausgeführten Reaktion (12) so gering, daß die Reaktion nur mit empfindlichsten Methoden nachgewiesen werden kann, und zweitens würde die Energie roter Lichtquanten (mit denen die Photosynthese möglich ist!) nicht zum Ablauf der Reaktion (12) in dem für die Umkehrung der Atmungsvorgänge nötigen Maße ausreichen. Werden bei der Photolyse des Wassers tatsächlich zwei Wasserstoffatome auf einen Acceptor übertragen, wie dies in Gleichung (12) formuliert ist, so könnte mit den bei rotem Licht zur Verfügung stehenden 43 kcal in einer 1-Quantenreaktion nur Cofermente vom Potential ca. 0 Volt zu 50% reduziert

²⁰) Wir haben die spezifische Hemmung der Photosynthese ohne Beeinflussung der Atmungsgröße früher mit relativ hohen Dinitrophenol-Konzentrationen im alkalischen Medium demonstriert¹⁹). Im sauren Milieu erzielt man auf Grund des höheren Prozentsatzes an penetrierendem, undissoziertem Dinitrophenol mit wesentlich geringeren Konzentrationen denselben Effekt²⁰.

werden, also etwa Alloxazin-Proteide. Für das DPN-System wäre nur eine Reduktion von Bruchteilen von Promille möglich, und dieses Redoxpotential würde sicher bei weitem nicht ausreichen, um die im Zuge der Atmung ablaufenden Dehydrierungsprozesse umzukehren. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit hat Kandler²⁰) eine „Umkehrung der Atmungsketten-phosphorylierung“ bei der Photosynthese vorgeschlagen: durch Licht reduzierte Acceptor des energetisch möglichen, niederen Potentials (Alloxazin-proteide?) könnten bei ihrer Reoxydation zur Anhäufung von ATP Anlaß geben, das als Energiequelle für eine Wasserstoff-Übertragung auf Redoxsysteme höheren Potentials (Pyridin-cofermente?) dienen könnte. Strehler hat neuerdings eine Reihe von Argumenten, die für diese Hypothese sprechen, zusammengestellt²¹).

Die bisher beschriebenen Versuche und Überlegungen machen es — unabhängig vom detaillierten Mechanismus der einzelnen Reaktionsschritte — sehr wahrscheinlich, daß die Reaktionstypen der Kohlenhydrat-Oxydation bei Tier und Pflanze in umgekehrter Richtung an der Photosynthese beteiligt sind. Der einzige wesentliche Unterschied zwischen Pflanze und Tier wäre dann, daß erstere zusätzlich ein katalytisches System besitzen, das die Ausnutzung von Lichtenergie zur Wasserspaltung und damit zur Hydrierung biologischer Wasserstoff-Überträger gestattet. Ist dieses System vorhanden, so werden am Licht reduktive Carboxylierungen und eine intensive ATP-Erzeugung bei der Atmungsketten-phosphorylierung einsetzen, die zur Neusynthese von Zellsubstanz führen. Bei den heute lebenden grünen Pflanzen ist das zur Photolyse des Wassers notwendige System in den Chloroplasten lokalisiert, und es scheint, daß Chlorophyll, zusammen mit geeigneten Proteinen, der wesentliche Bestandteil dieses Systems ist. Wahrscheinlich ist das Chlorophyll-System entwicklungsgeschichtlich erst spät entstanden, da es ja nur zusammen mit einem Enzymsystem, wie es die heterotrophen Organismen besitzen, sinnvoll ist. Als erste Lebewesen müßte man dann heterotrophe Lebewesen annehmen, die ihre Energie und ihre Baustoffe von nicht biologisch entstandener organischer Materie bezogen. Erst später erwarben dann gewisse Organismen zusätzlich das zur Photolyse des Wassers befähigte System und es stellte sich der heute existierende Kreislauf zwischen CO₂ und organischer Materie ein²²).

Für den eigentlichen Mechanismus der primären Lichtreaktion gibt es heute nur Hypothesen. Eine der interessantesten stammt von Calvin²³) und nimmt an, daß die primär vom Chlorophyll aufgenommene Lichtenergie auf ein cyclisches 5-Ring-Disulfid (eventuell die Disulfid-Form der Thioctic acid) unter Aufspaltung der S—S-Bindung und Bildung eines Biradikals übertragen wird. Dieses Biradikal könnte Wasserstoff aus einem Donator aufnehmen, wobei Sauerstoff freigesetzt wird und das entstehende Diethiol zu Reduktionsprozessen zur Verfügung steht. Modellversuche von Calvin sprechen dafür, daß die Dissoziationsenergie einer solchen Disulfid-Bindung in der Größenordnung der Energie roter Lichtquanten (ca. 40 kcal) liegt.

Nachdem wir die prinzipiellen Reaktionstypen (Carboxylierungen, Hydrierungen, Atmungsketten-phosphorylierung) des photosynthetischen Kohlenhydrat-Aufbaues kennengelernt haben, wollen wir uns der Frage zuwenden, welche Reaktionswege im einzelnen in der intakten grünen Zelle eingeschlagen werden. Hierbei wird insbesondere zu prüfen sein, ob die von Ochoa künstlich zusammengesetzten Systeme tatsächlich in der intakten Zelle am Kohlenhydrat-Aufbau beteiligt sind.

²¹) B. L. Strehler, Phosphorus Metabolism II, Baltimore 1952, S. 491.

²²) Siehe hierzu A. Pirson, Fortschritte der Botanik XIV [1953], S. 321 u. A. I. Oparin, „Die Entstehung des Lebens auf der Erde“, Berlin/Leipzig 1949.

²³) M. Calvin u. J. A. Barltrop, J. Amer. Chem. Soc. 74, 6153 [1952].

Die Reaktionsschritte beim photosynthetischen Kohlenhydrataufbau

Ochoa hat 1946 die Möglichkeit zur Diskussion gestellt, daß bei der Photosynthese der Citronensäure-Cyclus in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen wird²⁴⁾. Hierbei würden die bei der Photolyse des Wassers entstehenden hydrierten Pyridin-cofermente durch ihren „Wasserstoff-Druck“ veranlassen, daß Oxalessigsäure durch Aufnahme von zwei Molekülen CO_2 und acht Wasserstoff-Atomen über die Zwischenglieder des Citronensäure-Cyclus in Citronensäure übergeführt wird. Die Citronensäure würde zur Bildung von „aktivierter Essigsäure“ führen und dabei Oxalessigsäure regenerieren, die von neuem in den CO_2 fixierenden Cyclus eintreten könnte. Die hierbei anfallende „aktivierte Essigsäure“ könnte dann durch erneute CO_2 -Aufnahme über verschiedene Hydrierungsstufen das Embden-Meyerhof-Schema bis zur Stufe des Kohlenhydrats durchlaufen.

Diese Theorie steht mit allen im Vorhergehenden genannten Befunden im Einklang. Sie mußte später aber doch verlassen werden, da Photosyntheseversuche mit radioaktiv markiertem CO_2 einwandfrei ergaben, daß Citronensäure nicht zu den primären CO_2 -Fixierungsprodukten bei der pflanzlichen Photosynthese gehört. Diese Versuche, die insbes. von Calvin, Benson und ihren Mitarbeitern ausgeführt wurden²⁵⁾, haben eine erste Möglichkeit gegeben, die Einbaustufen des CO_2 bei der Photosynthese an intakten Zellen und Geweben zu studieren. Sie sollen deshalb im folgenden etwas ausführlicher besprochen werden.

Versuche mit radioaktiv markiertem CO_2

Calvin und Benson belichten Chlorella- oder Scenedesmus-Zellen bei Anwesenheit von ^{14}C markiertem CO_2 . Stoppt man nach einer kurzen Belichtungszeit durch Eingießen der Suspension in Alkohol, so gewinnt man einen Extrakt, bei dem die in verschiedenen Substanzen vorliegende Radioaktivität ein Maß für die mehr oder weniger aktive Beteiligung dieser Substanzen am CO_2 -Fixierungs-Prozeß ist. Die Identifizierung der markierten Verbindungen wird sehr elegant durch papierchromatographische Trennung mit anschließender „Radioautographie“ ausgeführt. Bereits die ersten Versuche ergaben, daß schon nach wenigen Minuten Belichtung die Hauptfixierungsprodukte Kohlenhydrate sind, und daß bei weiterer Belichtung der markierte Kohlenstoff auf sämtliche Zellinhaltsstoffe (Fett, Aminosäuren, Eiweiß usw.) verteilt wird. Dies steht völlig im Einklang mit den oben genannten modernen Vorstellungen vom Chemismus der Photosynthese: durch verschiedene Carboxylierungsreaktionen werden Vorstufen der Kohlenhydrate synthetisiert, die dann über die vom Dunkelstoffwechsel bekannten Enzymsysteme den Aufbau der mannigfaltigen Zellinhaltsstoffe ermöglichen.

Ein entscheidender Fortschritt gelang durch Untersuchung der Kinetik der Bildung von ^{14}C -markierten Zwischenprodukten. Geht man nämlich zu immer kürzeren Belichtungszeiten über, so muß die „Verschmierung“ des ^{14}C auf die verschiedensten Zellinhaltsstoffe immer weniger ins Gewicht fallen, und man sollte, wenn man auf die Belichtungszeit Null extrapoliert, nur noch das primäre Fixierungsprodukt erfassen. Die Ergebnisse von Experimenten mit sehr kurzen Belichtungszeiten bis herunter zu 5 sec sind in Bild 4 wiedergegeben.

²⁴⁾ M. Calvin, Chem. Engng. News 31, 1622, 1735 [1953].

Man ersieht hieraus, daß insbes. Phosphoglycerinsäure mit proportional zur Zeit wachsender Aktivität markiert, also aus CO_2 synthetisiert wird. Auch Äpfelsäure und Sedoheptulose-phosphat fallen als früh markierte Syntheseprodukte auf. Diese Substanzen sind zweifellos primäre, oder in wenigen Syntheseschritten erreichte Fixierungsprodukte, während andere Verbindungen eine typische „Induktionszeit“ aufweisen, also erst in sekundären

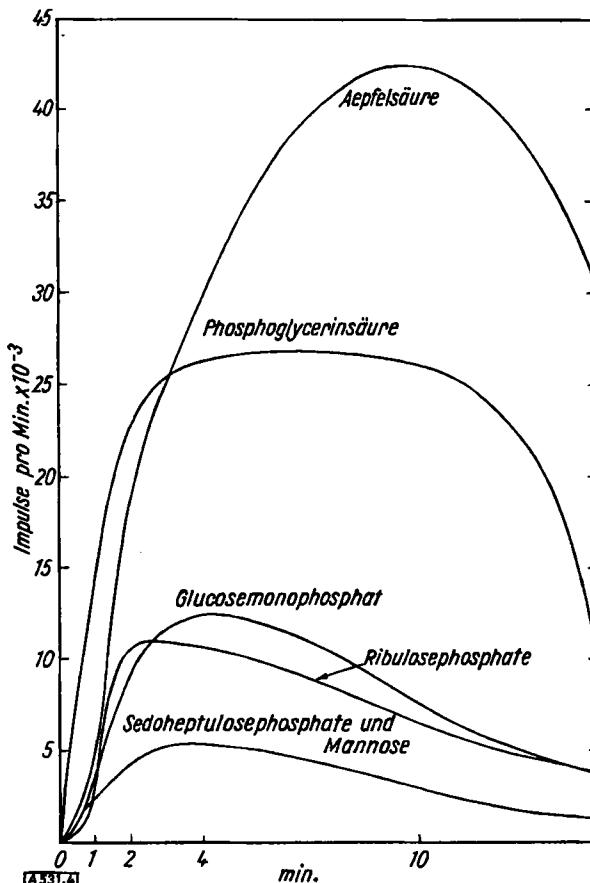


Bild 4
Kinetik der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung bei Scenedesmus²⁵⁾

Reaktionsfolgen aus den primär markierten Substanzen entstehen. Wesentlich ist bei diesen Experimenten, daß als Versuchsbeginn nicht das Einsetzen der Belichtung gewählt wird, denn dann müßten sich bei der Umstellung vom Dunkelstoffwechsel zum Photosynthese-Stoffwechsel Induktionsphänomene durch Verschiebung der stationären Zwischenstoffkonzentrationen ergeben. Werden dagegen belichtete, mit nicht markiertem CO_2 photosynthetisierende Zellen zur Zeit Null mit prozentual nicht ins Gewicht fallendem $^{14}\text{CO}_2$ versetzt, so verändern sich die stationären enzymatischen Prozesse nicht, und man erhält ein Bild des CO_2 -Einbaues bei der ungestörten, stationären Photosynthese.

Nachdem Citronensäure und eine Reihe weiterer Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus nicht unter den primären Fixierungsprodukten aufgefunden wurde, konnte eine Umkehrung des Citronensäure-Cyclus bei der Photosynthese ausgeschlossen werden. Auf Grund der Struktur der bisher gefundenen primären Fixierungsprodukte haben Calvin und Benson 1952 den in Bild 5 wiedergegebenen Cyclus für die Reaktionsfolge der Photosynthese vorgeschlagen.

²⁵⁾ A. A. Benson, S. Kawauchi, P. Hayes u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 74, 4481 [1952].

Auch dieser Cyclus ist eine Folge von Carboxylierungs- und Hydrierungsschritten, die wir im einleitenden Teil dieser Arbeit als die Reaktionstypen der Photosynthese erkannt haben. Er steht daneben weitgehend im Einklang

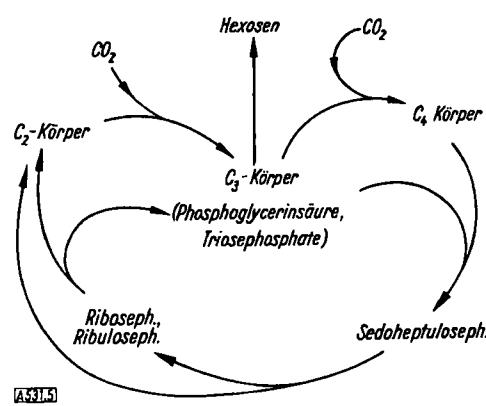


Bild 5
Photosynthetischen Cycles nach Calvin u. Mitarb.^{24, 25)}

mit den neuen Befunden mit ^{14}C markiertem CO_2 . Im Zusammenhang mit den Überlegungen zur Rolle der Umkehrung der Triosephosphat-Dehydrierung beim Photosyntheseprozess (Bild 2) soll hier besonders festgehalten werden, daß auch Calvin und Mitarbeiter als letzte Stufe der Kohlenhydrat-Synthese die Kondensation von zwei Molekülen Triosephosphat annehmen. Besonders begründet wird diese Annahme durch Befunde²⁴), wonach nach kurzfristiger Belichtung mit $^{14}\text{CO}_2$ die Aktivitätsverteilung in den C-Atomen der Phosphoglycerinsäure völlig der der $\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3$ bzw. $\text{C}_4\text{-C}_5\text{-C}_6$ -Bruchstücke der Hexosen entspricht (Tabelle 3).

Kohlenstoffatom	Aktivität
Glycerinsäure	COOH 49
	CHOH 25
	CH_2OH 26
Hexose	C_3, C_4 52
	C_2, C_5 25
	C_1, C_6 24

Tabelle 3

Dieses Ergebnis wird nur verständlich, wenn man Reduktion der Phosphoglycerinsäure zu Triosephosphat und Aldol-Kondensation der Triosephosphate zu Hexosediphosphat als Synthesemechanismus der Hexosen annimmt.

Der heuristische Wert der Versuche von Calvin und Mitarbeitern besteht nicht nur in ihrer Bedeutung als Grundlage für weitere Photosyntheseforschung, sondern auch in den Anregungen zu einer Intensivierung der Erforschung des Dunkelstoffwechsels in tierischen Geweben. So ist die von Calvin und Mitarbeitern als eines der zentralen Photosyntheseprodukte erkannte Sedoheptulose auch in den Brennpunkt der Erforschung des Stoffwechsels heterotroper Lebewesen gerückt. Insbesondere Horecker ist die Untersuchung der am Sedoheptulose- und Ribose-Stoffwechsel beteiligten Enzyme zu danken²⁶). Diese Versuche sind zwar heute noch nicht abgeschlossen, in Bild 1 ist aber die Rolle der C_6 - und C_7 -Zucker beim Kohlenhydratstoffwechsel nach unserem heutigen Wissen eingetragen. Die beteiligten Enzyme sind teils aus tierischen Geweben, teils aus Hefe und höheren Pflanzen angereichert worden.

²⁴⁾ B. L. Horecker u. P. Z. Smyrnios, J. Amer. Chem. Soc. 75, 1009, 2021 [1953].

Die beteiligten Fermentsysteme

Es ist zweifellos eine der wichtigsten Aufgaben der Biochemie, einzelne Fermente und Fermentsysteme in verschiedenen Zellen und Geweben zu identifizieren und ihre Wirkungsweise aufzuklären. Darüber darf aber nicht vergessen werden, daß erst Versuche an intakten Zellen und Geweben darüber Aufschluß geben können, welche Reaktionswege in einer lebenden Zelle tatsächlich eingeschlagen werden, wenn auf Grund des Enzymbestandes verschiedene Wege zur Verfügung stehen. Das klassische Schulbeispiel für solche Versuche ist die Aufklärung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels durch Hemmversuche an tierischen Geweben und Hefezellen. Lynen und Schachinger haben einige orientierende Versuche unternommen, diese Methodik mit Jodessigsäure als Hemmstoff auf photosynthetisierende Chlorella-Zellen anzuwenden. Wir haben diese Versuche auf Anregung von Prof. Lynen weitergeführt.

In Tabelle 2 ist gezeigt worden, daß Jodessigsäure den Dunkelstoffwechsel von Chlorella durch Blockierung der Triosephosphat-Dehydrase hemmt. Nimmt man mit Calvin und Benson an, daß die Umkehrung der Triosephosphat-Dehydrierung eine Zwischenstufe des photosynthetischen Kohlenhydrat-Aufbaues ist, so sollte Jodessigsäure Dunkelatmung und Photosynthese in annähernd demselben Maße hemmen. Bild 6 zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist.

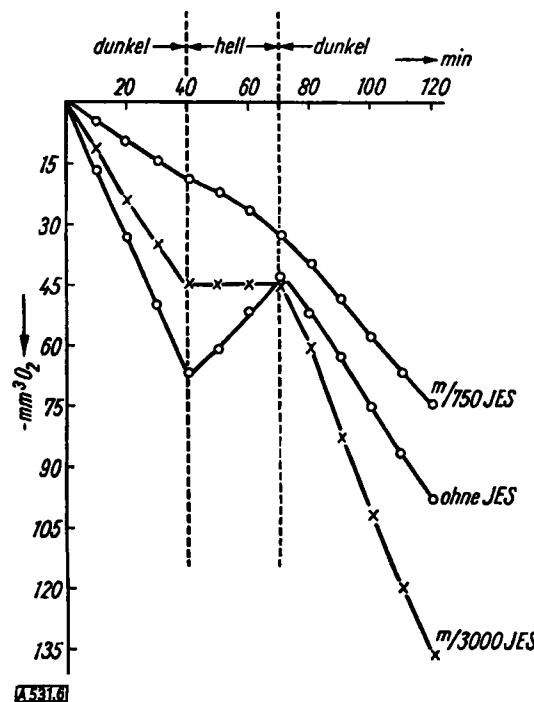


Bild 6
Jodessigsäure-Hemmung beim Hell-Dunkel-Wechsel (Chlorella)³.
Pro Gefäß 18 mg Trockengewicht; $T = 25^\circ\text{C}$;
sonst wie bei Bild 3.

Besonders interessant an der Kinetik der Jodessigsäure-Hemmung ist, daß nach Abschalten der Belichtung eine kurze Periode wesentlich gesteigerter Dunkelatmung folgt. Dieser Effekt läßt sich mehrmals wiederholen (Bild 7 s. Seite 72).

Die verständlichste Erklärung für diesen Effekt ist folgende: während der Lichtperiode stauen sich an der durch Jodessigsäure teilweise blockierten Stelle Produkte auf, die bei anschließender Dunkelheit rasch wieder oxydiert werden, da sie unterhalb der Blockierungsstelle des Kohlenhydrat-Stoffwechsels liegen. Hierfür spricht, daß nach

Ablauf der gesteigerten Dunkelreaktion die Atmungskurve wieder auf den Verlauf zurückfällt, der ohne eingeschaltete Lichtperiode vorgelegen hätte (gestrichelte Kurve!), und daß das Ausmaß der gesteigerten Dunkelreaktion mit der Länge der Lichtperiode anwächst (im Bereich kurzer Belichtungszeiten bis zu 20 min). Wir beabsichtigen diese Befunde durch Analyse stationärer Zwischenstoffkonzentrationen zu unterbauen.

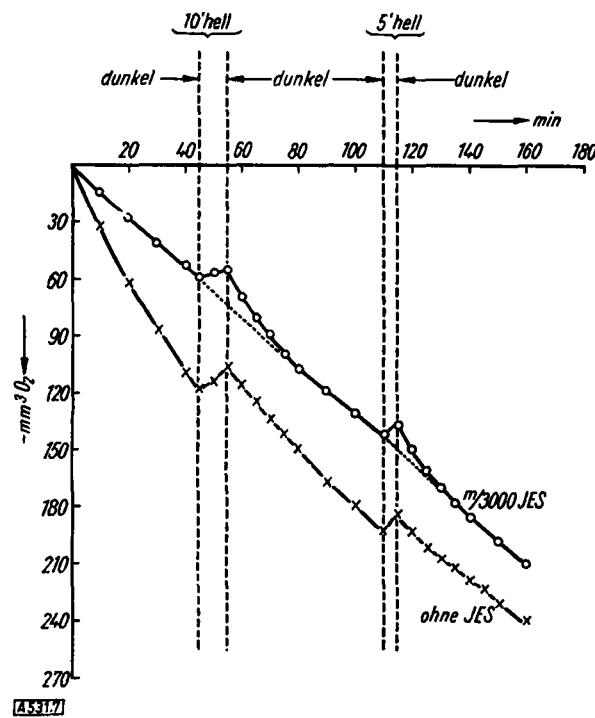


Bild 7
Kinetik der Jodessigsäure (JES)-Hemmung bei *Chlorella*.
Pro Gefäß 13 mg Trockengewicht; $T = 30^\circ\text{C}$;
sonst wie bei Bild 3

Ganz andere Verhältnisse liegen bei der Einwirkung von Jodacetamid auf *Chlorella*-Zellen vor, obwohl auch Jodacetamid in geringen Konzentrationen ein spezifisches Triosephosphat-Dehydrase-Gift ist. Suspziert man *Chlorella*-Zellen bei $\text{p}_\text{H} 9$, so hemmt m/1300 Jodacetamid die Photosynthese zu 90–100%, während die Dunkelatmung völlig unbeeinflußt bleibt. Vermutlich ist dieser Unterschied zur Jodessigsäure auf veränderte Permeabilitätsverhältnisse zurückzuführen. Bei Jodessigsäure kann nur der undissozierte Anteil die Zellmembran leicht penetrieren, während für Jodacetamid keine durch Ionisation bedingte Permeabilitätsschranke besteht. Es liegt daher nahe, daß Jodacetamid in geringen Konzentrationen, die die Triosephosphat-Dehydrase des Cytoplasmas der *Chlorella*-Zellen noch nicht merklich inaktivieren, weiter in die Chloroplasten vordringt und dort andere SH-Fermente, u. U. Systeme, die an der primären Lichtreaktion beteiligt sind, hemmt. Dagegen würde die im Cytoplasma der Algenzellen abgepufferte Jodessigsäure gegebenenfalls nicht, oder in nur geringem Maße in die Chloroplasten eindringen können und so eine Hemmwirkung auf die primäre Lichtreaktion unterbleiben. Möglicherweise sind damit auch Befunde von *Calvin* und Mitarbeitern erklärbar²⁷), wonach bei Jodacetamid-gehemmter Photosynthese unter $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre kein Aufstau von radioaktiv markierter Phosphoglycerinsäure stattfindet, obwohl man einen

²⁷⁾ M. Calvin u. Mitarb. in *Symposia of the Soc. f. Experimental Biology* No. V, S. 302, Cambridge 1951.

solchen Stau erwarten müßte, wenn das SH-Reagenz allein bei der Stufe der Triosephosphat-Dehydrierung in das Photosynthesegeschehen eingreifen würde.

Bei der Hemmung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels von *Chlorella* durch verschiedene Fluorid-Konzentrationen findet man wie bei Jodessigsäure größtenteils gleiche Hemmung von Dunkelatmung und Photosynthese (Tab. 4).

Manometrische Ansätze: 0,3 ml m/2 Citratpuffer $\text{p}_\text{H} 5,4$; *Chlorella*-Zellen: 11 mg Trockengewicht pro Gefäß; NaF der angegebenen Konzentration; mit H_2O auf 1,5 ml aufgefüllt; im Einsatz 0,5 ml *Pardee-Puffer*²⁸⁾ (entsprechend 1% CO_2 in der Gasphase); Temp. = 23°C

Konz. an Fluorid	m/31	m/27	m/25	m/20
Atmung (in % des Wertes ohne Fluorid)	100	39	25	0
Photosynthese (in % des Wertes ohne Fluorid)	100	47	10	0

Tabelle 4

Aus der Kinetik des Vorgangs ersieht man (Bild 8), daß hier kein manometrisch beobachtbarer Anstau von Substanzen eintritt, der wie bei der Jodessigsäure-Hemmung zu einer gesteigerten Dunkelatmung nach einer Lichtperiode führen müßte.

Die Kombination von Hemmversuchen mit der Analyse stationärer Zwischenstoffkonzentrationen könnte auch hier weitere Einblicke in das Zusammenwirken der Fermente bei Licht- und Dunkelreaktion bringen.

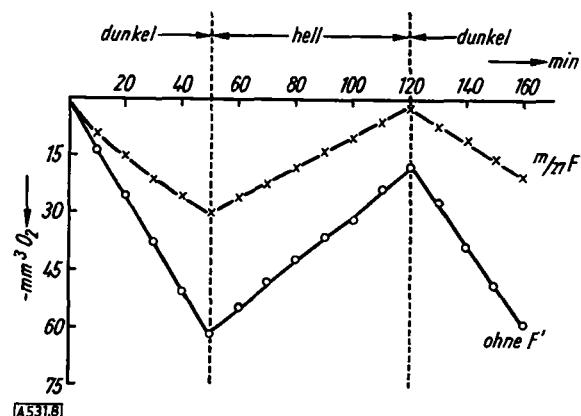


Bild 8
Kinetik der Fluorid-Hemmung von Atmung und Photosynthese.
Alle Bedingungen wie bei Tabelle 4

Zusammenfassend kann man sagen, daß insbesondere die Experimente des Arbeitskreises um M. Calvin Anhaltspunkte für die Aufklärung einzelner an der Photosynthese beteiligter Fermentreaktionen gegeben haben. Aufgabe weiterer Untersuchungen wird es sein, dieses Netzwerk mit Details auszufüllen. Hierzu gehört besonders die Kenntnis der Fermente, die chemische Veränderungen an den bisher sichergestellten Zwischenprodukten bewirken. Man wird dann versuchen müssen, die mit radioaktiv markiertem CO_2 gewonnenen Befunde mit dem Enzymbestand der grünen Zellen so zu koordinieren, daß sich ein sinnvolles Reaktionsschema ergibt. Schließlich wird man durch Experimente mit intakten Zellen, insbes. Messungen der Verschiebung stationärer Zwischenstoff-Konzentrationen die quantitative Bedeutung postulierter Reaktionsschemata erfassen suchen.

Zum Abschluß des Kapitels über den Chemismus der Photosynthese sei die Entwicklung unserer Anschauungen in den letzten Jahrzehnten noch einmal schematisch dargestellt (Bild 9a, b, c).

Man hat sich lange Gedanken darüber gemacht, wie das Zusammenwirken mehrerer Lichtquanten zur Reduktion einer Molekül CO_2 zustande kommen kann. Berücksichtigt man die im vorhergehenden gebrachten Experimente und

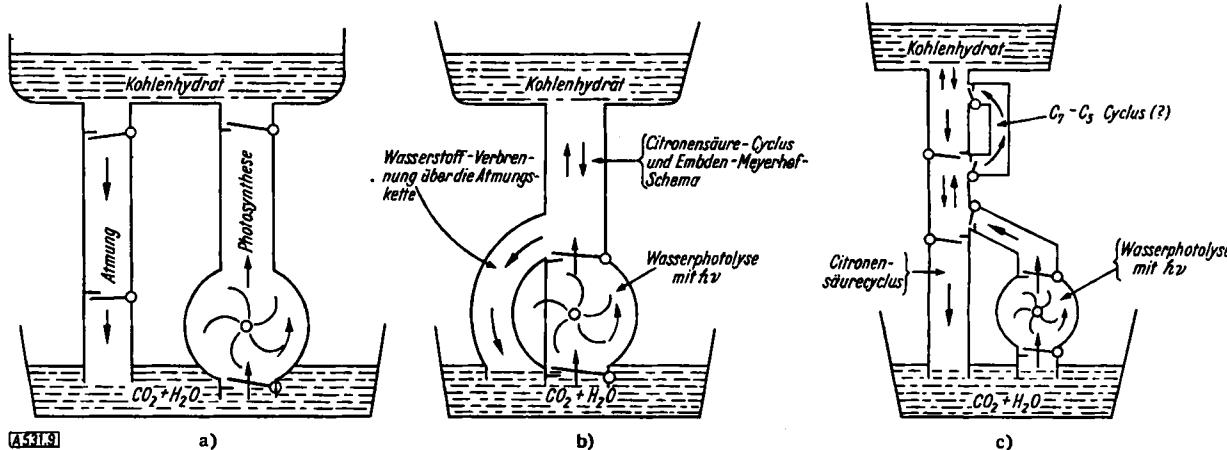


Bild 9. Entwicklung der Anschauungen über den Chemismus der Photosynthese.
a) ältere Vorstellung; b) Ochoa 1946; c) Calvin, Ochoa 1952

Während man früher annahm, daß Atmung und Photosynthese über völlig verschiedene Reaktionswege erfolgen (Bild 9a), postulierte Ochoa 1946 auf Grund vielseitiger experimenteller Befunde die Photosynthese als eine völlige Umkehrung der Atmungsvorgänge, abgesehen von der eigentlichen, hydrierte Cofermente liefernden Lichtreaktion (Bild 9b). Die Versuche mit radioaktiv markiertem CO_2 ergaben dann, daß zwar einzelne Reaktionsstufen sehr wahrscheinlich identisch sind, jedoch gewisse Reaktionsfolgen bei der Photosynthese durch Fermentsysteme katalysiert werden, die an der Atmung nicht oder wenig beteiligt sind (Bild 9c). Allerdings muß hier betont werden, daß der bei der Photosynthese zweifellos eine wichtige Rolle spielende Horecker-Cyclus mit seinen Zwischenprodukten Sedoheptulose und Ribulose u. U. bei der Dunkelatmung von Pflanzen und Tieren eine quantitativer größere Bedeutung besitzt, als man bislang annimmt.

Energetik

Bei der Photosynthese der grünen Pflanzen wird im Endeffekt Lichtenergie dazu ausgenutzt, chemische Energie zu gewinnen, d. h. aus CO_2 und Wasser das wesentlich energiereichere Kohlenhydrat aufzubauen. Schon früh hat der zahlreiche Zusammenhang dieser Energieumwandlung das Interesse der Naturforscher wachgerufen. Die ersten exakten Messungen wurden 1923 von O. Warburg und seinen Mitarbeitern vorgenommen. Sie ergaben, daß ca. vier Lichtquanten (unabhängig von der Wellenlänge des Lichtes) unter optimalen Bedingungen notwendig sind, um eine Molekül CO_2 in die Kohlenhydratstufe zu überführen bzw. eine Molekül O_2 freizusetzen. O. Warburg hat seine Versuche in den letzten Jahren mit verbesserter Methodik wiederholt und das genannte Ergebnis bestätigt, als Grenzwert sogar einen Bedarf von nur drei Lichtquanten gefunden. Zwar hat eine Reihe, insbesondere amerikanischer Forscher diesen hohen Wirkungsgrad nie erreichen können²⁸⁾, aber man darf wohl mit Warburg sagen, daß entscheidend der unter optimalen Bedingungen maximal erreichbare Wirkungsgrad ist und nicht geringere Energieausnützungen, die auf nicht optimalen Bedingungen beruhen.

²⁸⁾ Zusammenfassung siehe z. B. Photosynthesis in Plants, Ames Iowa, [1949].

Überlegungen, so entfällt diese Schwierigkeit. Die Lichtquanten sind allein dazu notwendig, Wasser zu spalten und zu Reduktionen befähigten Wasserstoff zur Verfügung zu stellen. Damit können dann reduktive Carboxylierungen ablaufen bzw. bei der Reoxydation der hydrierten Aczeptoren energiereiche Phosphat-Bindungen erzeugt werden. Die Photolyse des Wassers wird wie alle bisher in ihrem Mechanismus aufgeklärten photochemischen Reaktionen ein 1-Quantenprozeß sein. Über den Anstau hydrierter Cofermente kann sich dann die Wirkung beliebig vieler Quanten zur Photosynthese addieren, ohne daß ein gleichzeitiges Zusammenwirken notwendig ist. Insbesondere wird man keine in ihrer Größe festgelegte, ganzzahlige Quantenausbeute erwarten können, eine Aussage, die für die Diskussion von Versuchen zum Energiebedarf der Photosynthese von Bedeutung ist.

Vor 3 Jahren teilten Burk und Warburg²⁹⁾ manometrische Experimente mit, die dafür sprechen, daß die 1-Quantenreaktion bei der Photosynthese direkt meßbar ist. Belichtet man Chlorella-Zellen, deren Atmung durch eine geringe Lichtintensität vorkompensiert wurde, mit einer zusätzlichen, gemessenen Lichtintensität und beobachtet in kurzen Zeitabständen die Druckänderungen im Gasraum, so ergibt sich, daß bei Extrapolation auf den Beginn der Belichtung eine Quantenausbeute von eins vorliegt. Das heißt: je ein Lichtquant führt zur Fixierung einer Molekül CO_2 und zur Entbindung einer Molekül O_2 . Schon nach wenigen Sekunden nimmt die manometrisch meßbare Leistung des Lichtes ab, und nach ca. 3 min hat sich der stationäre Zustand der Photosynthese eingestellt: Zur Fixierung einer Molekül CO_2 sind 3–4 Lichtquanten notwendig. Schaltet man jetzt das zusätzliche Licht ab, so beobachtet man eine intensive Sauerstoff-Aufnahme und CO_2 -Entwicklung, die rasch abklingt und nach ca. 3 min dazu führt, daß pro absorbiertes Lichtquant nur noch $\frac{1}{3}$ Molekül CO_2 fixiert vorliegt, so wie es auch bei der stationären Photosynthese der Fall ist. Durch ständig wiederholten 3-Minuten-Wechsel von Licht und Dunkelheit läßt sich demnach die Photosynthese aufspalten in eine mit der Quantenausbeute 1 erfolgende Lichtreaktion und in eine Dunkelreaktion, die den Gewinn der Lichtreaktion zu $\frac{2}{3}$ wieder beseitigt, so daß in der Bilanz über eine

²⁹⁾ D. Burk u. O. Warburg, Naturwiss. 37, 560 [1950].

längere Versuchperiode eine Quantenausbeute von $\frac{1}{3}$ (bis $\frac{1}{4}$), wie man sie auch bei nicht intermittierender Belichtung mißt, zustande kommt (Bild 10). Nach Burk und Warburg wirken die kurzfristig beobachtbaren Dunkel- und Hell-Vorgänge bei der stationären Photosynthese in einem Kreisprozeß zusammen.

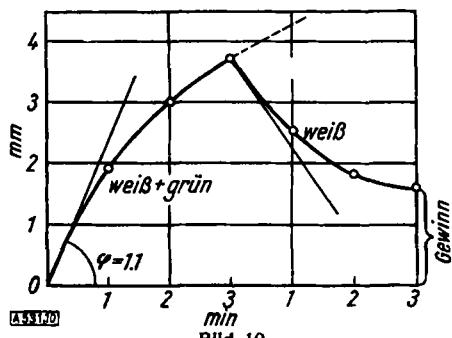


Bild 10

Aufspaltung der Photosynthese in Lichtreaktion und Rückreaktion³⁰⁾. Weißes Licht zur dauernden Kompensation der Atmung. Grünes Licht: zusätzliches Licht, dessen photosynthetische Wirksamkeit gemessen wird. φ - Quantenausbeute - Mole O₂ pro Mole Lichtquanten

Thermodynamisch gesehen ist es unmöglich, mit 43 kcal, dem Energieinhalt der energieärmsten bei der Photosynthese wirksamen Lichtquanten, eine Molekel CO₂ auf die Stufe des Kohlenhydrates zu überführen. Hierfür sind 112 kcal notwendig. Bild 11 zeigt, wie man sich trotzdem, aufbauend auf die in den ersten Abschnitten diskutierten Befunde, das Zusammenwirken mehrerer 1-Quantenprozesse zum Vorgang der stationären Photosynthese vorstellen kann¹⁹⁾.

In a) ist die von Warburg durch Extrapolation auf den Beginn der Belichtung isolierte Hellreaktion angegeben, bei der die Energie jedes Lichtquants durch Wasserspaltung dazu ausgenützt wird, um CO₂ reduktiv in Verbindungen zu fixieren, die gegenüber den Ausgangsprodukten ein Plus an freier Energie von ca. 40 kcal besitzen. In b) ist die sofort nach Lichtabschalten beobachtbare Dunkelreaktion wiedergegeben, die eine Umkehrung des 1-Quantenprozesses am Licht darstellt, d. h. eine Reoxydation

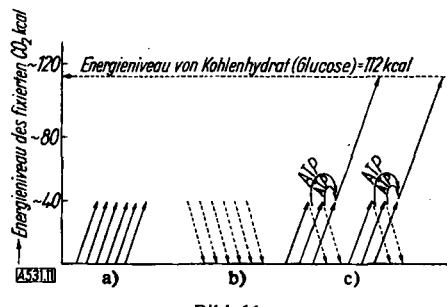


Bild 11

1-Quantenprozeß und Energieübertragung bei der Photosynthese
a) kurzfristige Hellreaktion; b) anschließende kurzfristige Dunkelperiode; c) stationäre Photosynthese

der durch hydrierende Carboxylierung entstandenen Substanzen. Aus c) ist das stationäre Zusammenwirken beider Prozesse ersichtlich: $\frac{2}{3}$ der in der Hellreaktion entstandenen Substanz werden wieder verbrannt, die Energie dieses Prozesses durch den Mechanismus der Atmungsketten-phosphorylierung als energiereiches Phosphat zur Verfügung gestellt, und damit das restliche Drittel auf das 112 kcal-Niveau des Kohlenhydrates gehoben. Bei kurzdauernden Versuchen tritt der 1-Quantenprozeß in den Vordergrund, da genügend Zwischenstoffe vorliegen, an

³⁰⁾ O. Warburg, ebenda 39, 337 [1952].

die CO₂ hydrierend fixiert werden kann. Bei längerdauernden Versuchen kann allein die Bilanzreaktion gemessen werden.

Das bei der Dunkelatmung im Zuge der Atmungsketten-phosphorylierung erzeugte ATP kann nur in ganz geringem Maße zur CO₂-Fixierung ausgenützt werden, weil hier der starke „Wasserstoff-Druck“ fehlt, der zusammen mit energiereichem Phosphat eine obligate Voraussetzung für das quantitative Vorherrschen synthetischer Reaktionen ist.

Vor kurzem hat J. Franck³¹⁾ eine von Warburgs Ansicht abweichende Deutung der manometrischen Experimente zum 1-Quanteneffekt gegeben. Franck nimmt an, daß bei kurzfristiger Belichtung nicht komplette Photosynthese, sondern CO₂-Fixierung an Zwischenprodukte der Atmung stattfindet. Dadurch würden die Dissimulationsprozesse bei Belichtung in ihrem Ausmaß verringert, d. h. zur Berechnung der Quantenausbeute ist nicht eine unveränderte Dunkelatmung zugrunde zu legen, sondern eine verringerte (scheinbare) Atmung³²⁾. Damit ergäbe sich eine geringere Energieausnutzung bei der Photosynthese. Zwar hält es auch Franck für wahrscheinlich, daß die primäre Lichtreaktion eine 1-Quantenreaktion ist, aber unvermeidliche Energieverluste müssen sich so auswirken, daß der 1-Quanteneffekt nicht mit der üblichen manometrischen Methode meßbar wird. In Bild 12 ist die Auswirkung der Einwände von Franck schematisch wiedergegeben.

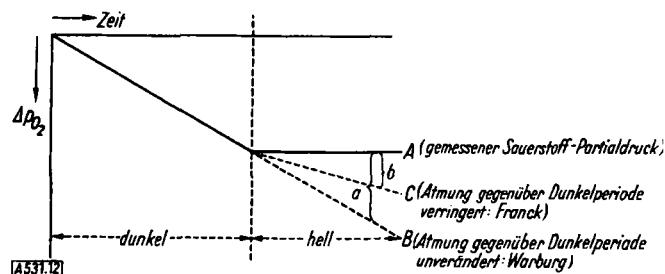


Bild 12

In der Abbildung ist nur die kurze Periode nach Einschalten des Lichtes eingetragen, während der der reine 1-Quanteneffekt beobachtbar ist. Der Einfachheit halber sind Druckänderungen aufgetragen, wie man sie erwarten müßte, wenn nur Sauerstoff am Gaswechsel beteiligt wäre (man kann sich eine Meßanordnung vorstellen, wie sie mit dem von Pardee³³⁾ beschriebenen Puffer verifizierbar ist). Bei der Dunkelperiode ist die stationäre Sauerstoff-Aufnahme eingezeichnet. Belichtet man nun, so wird die Sauerstoff-Aufnahme geringer, bzw. es findet Sauerstoff-Entwicklung statt. Es sei angenommen, daß die zur Messung benutzte Lichtmenge³⁴⁾ gerade zur Kompensation der Atmung ausreicht. Dann wird man nach Belichtung keine Druckänderung mehr erhalten, also die mit A bezeichnete Kurve registrieren. So weit das, was man tatsächlich am Manometer beobachtet. Warburg deutet nun das Experiment folgendermaßen: die Atmung würde bei Ausbleiben der Belichtung mit unveränderter Größe weiterlaufen (Kurve B), die durch das Licht bewirkte Photosynthese

³¹⁾ J. Franck, Arch. Biochemistry 45, 190 [1953].

³²⁾ Auf Grund der modernen Anschauungen zum Mechanismus der Photosynthese ist der alte Streit, ob die Atmung während der Photosynthese gegenüber der Dunkelreaktion unverändert sei, gegenstandslos geworden. Sind Zwischenprodukte und Enzymsysteme der Atmung auch am Photosyntheseprozess beteiligt, so kann man die Photosynthese als einen „Rückstau“ der Atmung bezeichnen, der durch Verschiebung der dynamischen Gleichgewichte zwischen Hin- und Rückreaktion verschiedener Enzymsysteme zustande kommt (siehe hierzu Bild 9).

³³⁾ A. Pardee, J. biol. Chemistry 179, 1085 [1949].

³⁴⁾ In der in Betracht kommenden, wenige Sekunden nach Licht-einschalten währenden Periode.

(Sauerstoff-Entwicklung) entspricht demnach der Differenz a zwischen den Kurven A und B. Nach Franck werden bei Einsetzen der Belichtung Zwischenprodukte der Atmung hydriert und carboxyliert, d. h. die am Anfang der Belichtungsperiode vorliegende (hypothetische) Atmung ist kleiner als bei der Dunkelperiode (Kurve C), da ein Teil der Atmungsprodukte nicht weiter verbrannt wird³²⁾. Die durch das Licht bewirkte Photosynthese entspricht dann der Differenz b zwischen den Kurven A und C. Warburg bezieht die eingestrahlten Lichtquanten auf die durch Abschnitt a wiedergegebene photosynthetische Leistung und erhält eine Quantenausbeute³³⁾ von 1, Franck bezieht die eingestrahlten Quanten auf die durch Abschnitt b wiedergegebene photosynthetische Leistung und erhält eine wesentlich kleinere Quantenausbeute. Die nach Abschalten des Meßlichtes von Warburg beobachtete kurzfristige Steigerung der Atmung steht auch mit der Deutung von Franck im Einklang: es würde sich hierbei um Auffüllung der bei der kurzfristigen Photosynthese verbrauchten Atmungzwischenprodukte handeln. Selbstverständlich gelten dieselben Überlegungen, wenn man mit kompensierter Atmung beginnt und die Quantenausbeute einer zusätzlichen, zur Steigerung des O₂-Partialdruckes führenden Lichtmenge mißt.

Die angeführten theoretischen Überlegungen Francks stehen in keiner Beziehung zu Warburgs Messungen der Quantenausbeute bei der stationären Photosynthese. Es handelt sich lediglich um die Frage, ob der aus physikalischen Gründen zufordernde 1-Quanten-Mechanismus der

³²⁾ Definition der Quantenausbeute siehe Legende zu Bild 10.

primären Lichtreaktion mit der klassischen manometrischen Methode beobachtbar ist. Schneller ansprechende und empfindlichere Meßmethoden für CO₂ und O₂ könnten hier eine Entscheidung bringen. Deshalb bleiben auch die oben auf der Basis des 1-Quarteneffektes diskutierten Möglichkeiten der Energieübertragung bei der Photosynthese von diesen Überlegungen unberührt.

Nimmt man 40 kcal benötigte reduktive CO₂-Fixierungen als primäre Einbaureaktionen der Photosynthese an, so sollte es möglich sein, unter den verschiedenen in Frage kommenden Carboxylierungsreaktionen die energetisch „passende“ Reaktion auszuwählen. Solche Überlegungen sind vorerst nicht möglich, da zur Berechnung der für einen Reaktionsschritt notwendigen freien Energie auch die stationären Konzentrationen der beteiligten Metaboliten in der lebenden Zelle bekannt sein müßten. Die Suche wird durch die große Zahl von vielfältig gekoppelten und verzweigten, durch Fermente ermöglichten Reaktionswege in der Zelle noch weiter kompliziert. Prinzipiell kann die Thermodynamik zwar energetisch nicht mögliche Reaktionen ausschließen, aber keine Aussage über den tatsächlich eingeschlagenen Reaktionsweg machen, wenn mehrere energetisch mögliche Wege zur Verfügung stehen. Man wird weitere Ergebnisse über die Enzyme und damit die möglichen Stoffwechselwege in pflanzlichen Geweben und Zellen abwarten müssen, um dann zusammen mit den energetischen und reaktionskinetischen Gegebenheiten zu Schlüssen über den detaillierten Mechanismus der Photosynthese zu kommen.

Eingeg. am 24. Oktober 1953 [A 531]

Reinheitsprüfungen an Benzol mittels Messungen der Dielektrizitätskonstanten und der Absorption im Ultrarot

Von Prof. Dr. R. MECKE und cand. chem. K. ROSSWOG

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br.

Es wird gezeigt, daß die Konzentrationsbestimmung und Reinheitsprüfung durch DK-Messungen selbst im ungünstigen Falle unpolarer Systeme anderen physikalischen Methoden (Dichtemessung, Refraktometrie, Kryoskopie, UV- und UR-Absorptionsspektralanalyse) gleichwertig ist. Es wird der zeitliche Verlauf des Trocknungsvorganges von Benzol in der von Schupp und Mecke¹⁾ beschriebenen Trockenapparatur für Lösungsmittel untersucht.

Für die meisten Messungen von Dielektrizitätskonstanten (DK) verwendet man Relativmethoden, für welche man Eichsubstanzen benötigt. Die DK solcher Eichsubstanzen muß aus Absolutmessungen möglichst genau bekannt sein. Meist werden Luft und Benzol hierzu verwandt. Die DK von trockener Luft ist aus meßtechnischen Gründen mit weit größerer Genauigkeit bestimmbar als die DK von Flüssigkeiten. Für Benzol nehmen die meisten Autoren den von Hartshorn und Oliver²⁾ absolut gemessenen DK-Wert von $\epsilon = 2,2825 \pm 0,0005$ an. Eigene Absolutmessungen, über die in einer weiteren Mitteilung berichtet werden soll, haben gezeigt, daß Absolutmessungen der DK reiner Flüssigkeiten mit einer Genauigkeit von $\pm 0,0001$ möglich sind, und den Wert von Hartshorn und Oliver bestätigt. Unsere Messungen ergaben aber auch, daß Benzole verschiedener Herkunft (selbst p.a., Benzol der Feinchemikalienindustrie) Abweichungen von diesem

für ein extrem gereinigtes und getrocknetes Benzol ermittelten DK-Wert aufweisen. Aus diesem Grunde kann der Standard-Wert von Hartshorn und Oliver von Benzol nur dann als Eichwert eingesetzt werden, wenn der Reinheitsgrad sorgfältig überprüft wurde.

Es soll hier gezeigt werden, daß diese Abweichungen im DK-Wert von Verunreinigungen des Benzols mit Toluol herrühren, und wie empfindlich dieses Reinheitskriterium einer DK-Messung ist.

Apparatives

Die DK-Messungen wurden in einer Meßanordnung von H. Schill³⁾, einer Weiterentwicklung der Apparatur von Schupp und Mecke⁴⁾, vorgenommen. Zur Messung der absoluten DK-Werte benutzten wir eine Meßzelle mit zwei verschiedenen, definierten Kapazitäten⁵⁾, für die übrigen Messungen den von Schupp und Mecke⁴⁾ angegebenen

¹⁾ R. Schupp u. R. Mecke, Z. Elektrochem. 52, 59 [1948].

²⁾ L. Hartshorn u. D. A. Oliver, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A 123, 664 [1929].

³⁾ H. Schill, Diplomarbeit, Freiburg i. Br., 1951.

⁴⁾ R. Schupp u. R. Mecke, Z. Elektrochem. 51, 40 [1948].

⁵⁾ Hierüber soll in Kürze berichtet werden.