B. Beispiel für ++-Reaktion			Drittel	Getestet mit 0,1 mg N AG	Präzipitat N [mg]
1 cm ³ AS <i>thermophilum</i> 35° 13-mal versetzt mit insgesamt 2,4 mg N AG <i>vulgare</i>			1.	<i>vulgare</i>	keins
Hälfte	Getestet mit 0,1 mg N AG	Präzipitat N [mg]	2.	<i>dahlemense</i>	0,150
			3.	<i>revirescens</i>	keins
1.	<i>vulgare</i>	keins	Fräulein LIESELOTTE SISKÄ danke ich für die zuverlässige Unterstützung bei der Durchführung der vorstehenden Untersuchungen, Herrn Professor Dr. H. FRIEDRICH-FREKSA und Herrn Dr. E. WEILER für einführende Beratung bei der Anwendung der serologischen Methoden, Herrn Professor Dr. G. MELCHERS für die Diskussion der Befunde.		
2.	<i>thermophilum</i> 35°	0,082			
C. Beispiel für +++-Reaktion					
1,5 cm ³ AS <i>dahlemense</i> 18-mal versetzt mit insgesamt 3,35 mg N AG <i>vulgare</i>					

Glutaminsäure in *Chlorella*

Von OTTO WARBURG, HELMUT KLOTZSCH und GÜNTER KRIPPAHL

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

(Z. Naturforschg. 12 b, 622—628 [1957] ; eingegangen am 10. August 1957)

Versuche über Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure in lebender *Chlorella* und über den Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Photosynthese.

Wie bereits kurz mitgeteilt¹, stammt die Kohlensäure, die Fluorid aus lebender *Chlorella* entwickelt², aus der α -Decarboxylierung der Glutaminsäure:

Glutaminsäure = γ -Aminobuttersäure + CO₂
eine Reaktion, die ACKERMANN³ 1910 in Bakterien entdeckte und die seitdem weitverbreitet in Tier- und Pflanzenreich gefunden worden ist⁴⁻⁷.

Auch gefroren-getrocknete *Chlorella* ist als Ferment dieser Reaktion wirksam, jedoch wesentlich schwächer, als lebende *Chlorella*. Bei 20° ist die Halbwertszeit für 100 mm³ lebende *Chlorella* 5 Min., für die daraus gewonnene Trockensubstanz 50 Minuten.

Daß die erhebliche und schnelle Kohlensäure-Entwicklung, die bei Zusatz von Fluorid zu lebender *Chlorella* gefunden wird, von einer Decarboxylierung der Glutaminsäure herrührt, ist durch Manometrie gefunden und durch Papierchromatographie bestätigt worden. Immer, wenn Fluorid Kohlensäure aus *Chlorella* entwickelt, nimmt die Glutaminsäure ab und die γ -Aminobuttersäure nimmt zu; und immer, wenn die Fluoridwirkung gehemmt wird,

z. B. durch Blausäure oder durch Sauerstoff, wird auch die Zersetzung der Glutaminsäure gehemmt.

Chlorella enthält je nach der Züchtung 0,5 bis 1,3% ihrer Trockensubstanz an Glutaminsäure, und zwar um so mehr Glutaminsäure, als sie Chlorophyll enthält. Beträgt der Chlorophyllgehalt 5 bis 8%, so kommt 1 Mol. bis 2 Mole. Glutaminsäure auf 1 Mol. Chlorophyll. Wahrscheinlich ist in diesen Zellen alle Glutaminsäure an Chlorophyll gebunden. Sehr chlorophyllarme Zellen enthalten mehr Glutaminsäure, als Chlorophyll. Wahrscheinlich ist in diesen Zellen ein Teil der Glutaminsäure frei, ein Teil an Chlorophyll gebunden.

Es ist eine sehr wichtige Tatsache, daß Sauerstoff die Zersetzung der Glutaminsäure durch Fluorid hemmt. Die Erklärung ist, daß bei Zusatz von Fluorid die Atmung steigt und daß durch die Energie der gesteigerten Atmung die zersetzte Glutaminsäure wieder soweit aufgebaut wird, bis Zersetzung durch Fluorid und Wiederaufbau durch die Atmung sich die Waage halten. Zum Beispiel zersetzt n/1000-Fluorid anaerob die Glutaminsäure vollständig,

¹ O. WARBURG, H. KLOTZSCH u. G. KRIPPAHL, Z. Naturforschg. 12 b, 266 [1957].

² O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, Z. Naturforschg. 11 b, 718 [1956].

³ D. ACKERMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 69, 279 [1910].

⁴ K. OKONUKI, Botan. Mag. [Tokio] 51, 270 [1937].

⁵ E. S. TAYLOR u. E. F. GALE, Bioch. J. 39, 52 [1945].

⁶ O. SCHALES, V. MIMS u. S. SCHALES, Arch. Biochemistry 10, 455; 11, 155 [1946].

⁷ E. ROBERTS u. S. FRANKEL, J. biol. Chemistry 190, 505 [1951].

aerob aber, wegen des Wiederaufbaus, nur zu einem kleinen Teil.

Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure in lebender *Chlorella*, die durch Fluoridzusatz manifest werden, sind Reaktionen die einen Umsatz von der Größenordnung des Energie-Stoffwechsels haben. Die Idee, daß sie im Mechanismus der Photosynthese eine Rolle spielen, wird nahegelegt durch die Analogie der durch Licht und durch Fluorid induzierten Atmung, deren Energie in beiden Fällen zu Reaktionen benutzt wird, an denen die Kohlensäure beteiligt ist.

Man kann diese Idee prüfen, indem man die Glutaminsäure zersetzt und dann die Lichtwirkung mißt. Es zeigt sich dann, daß die Lichtwirkung in dem Maße sinkt, als die Glutaminsäure zersetzt wird; und daß die Lichtwirkung in dem Maße wieder steigt, in dem die Glutaminsäure wieder aufgebaut wird.

Die Beteiligung der Glutaminsäure an der Wirkung des Lichts scheint uns durch derartige Versuche bewiesen zu sein, doch ist auf Grund von Versuchen⁸ mit radioaktiver Kohlensäure daran zu denken, daß ein System Asparaginsäure – Alanin der Glutaminsäure vorgeschaltet ist, da bei Belichtung die Radioaktivität früher in Asparaginsäure als in Glutaminsäure erscheint.

Asparagin kommt in sehr kleinen Mengen, Alanin in größeren Mengen in *Chlorella* vor. Eine Asparaginsäure-Decarboxylase haben wir bisher in *Chlorella* nicht nachweisen können.

Die beiden letzten Abschnitte dieser Arbeit betreffen die dissoziierende Kohlensäure der *Chlorella*, insbesondere diejenige dissoziierende Kohlensäure, die nur bei Gegenwart von Sauerstoff gefunden wird und die Beziehungen zur Glutaminsäure zu haben scheint. Während wir bei Belichtung keine Abnahme der Glutaminsäure in *Chlorella* gefunden haben, zeigte es sich, daß die dissoziierende Kohlensäure, wenn im Licht Sauerstoff entwickelt wird, erheblich abnimmt und in stark belichteten Zellen völlig verschwindet. Verdunkelt man dann wieder, so steigt die aerobe dissoziierende Kohlensäure im Verlauf von 20 Min. – das ist gerade die Zeit, in der die lichtinduzierte Atmung abklingt⁹ – wieder auf ihren Dunkelwert.

1. Die Versuchszellen und Versuchsmedien

Chlorella wurde in dem früher angegebenen Salzmedium¹⁰, unter Zusatz der Mikroelemente, in 250-mm³-Kolben, unter Durchleitung von 5 Vol.-Proz. CO₂ 30 Vol.-Proz. O₂ 65 Vol.-Proz. Argon, bei 25° gezüchtet. Belichtet wurde mit Tageslicht + Metallfadenlicht, oder nur mit Metallfadenlicht, kontinuierlich oder fluktuierend¹¹. Der Chlorophyllgehalt der Zellen hängt von der Lichtintensität bei der Zucht ab und wurde von 1% bis 8% der Trockensubstanz variiert. Wir bezeichnen in dieser Arbeit die verschiedenen Kulturen folgendermaßen:

Südzellen. Sie wurden an einem Südfenster unter Zusatz von 300 W Metallfadenlicht am Tage und 200 W Metallfadenlicht nachts gezüchtet. Sie vermehrten sich in 24 Stdn. von 60 auf 350 mm³ und in 48 Stdn. auf 650 mm³. Die 2-tägigen Südzellen enthalten 7 bis 8% ihres Trockengewichtes an Chlorophyll. Auf 1 Mol. Chlorophyll kommt in diesen Zellen fast genau 1 Mol. Glutaminsäure.

Nordzellen. Sie wurden ohne Zusatz von Tageslicht, in einem gegen außen verdunkelten Raum, mit 2 · 200 W Metallfadenlicht gezüchtet und vermehrten sich in 48 Stdn. von 60 auf 1500 mm³. Sie enthalten 5 bis 6% ihres Trockengewichtes an Chlorophyll. Auf 1 Mol. Chlorophyll kommt in diesen Zellen 1 Mol. bis 2 Mol. Glutaminsäure.

A-Zellen. Sie wurden ohne Tageslicht mit fluktuierendem Metallfadenlicht (300-W-Lampe, Spannung 3 Stdn. ansteigend von 50 auf 220 V, 9 Stdn. 220 V, 3 Stdn. absteigend, 9 Stdn. 50 V) gezüchtet und vermehrten sich in 24 Stdn. von 60 auf 160 mm³, in 48 Stdn. auf 350 mm³. Die 1-tägigen A-Zellen haben 4% ihres Trockengewichtes an Chlorophyll, die 2-tägigen haben 6% Chlorophyll. In diesen Zellen kommen etwa 1,5 Mole Glutaminsäure auf 1 Mol Chlorophyll.

x-Zellen. Sie entstehen, wenn die Kulturen sehr stark, ohne Tageslicht, mit 4 · 200-W-Metallfadenlampen belichtet werden, die von zwei Seiten nahe an die Kulturkolben herangebracht werden. Sie vermehren sich in 24 Stdn. von 60 auf 200 mm³. Sie enthalten etwa 1,2% Chlorophyll und 3- bis 5-mal soviel Mole Glutaminsäure als Chlorophyll.

Die x-Zellen verhalten sich auch sonst atypisch. Bringt man sie unter anaerobe Bedingungen, so bilden sie viel mehr und viel schneller Milchsäure als die andern Zellen. Die Folge davon ist, daß wegen der Säuerung anaerob bald eine Decarboxylierung der Glutaminsäure einsetzt, deren Kohlensäure von früheren Autoren irrtümlicherweise auf alkoholische Gärung zurückgeführt worden ist. Tatsächlich ist die Gärung der *Chlorella* eine reine Milchsäuregärung. Merkwürdigerweise aber ist diese Milchsäure nicht L-, sondern D-Milch-

⁸ O. WARBURG, H. KLOTZSCH u. G. KRIPPAHL, Z. Naturforschg. **12b**, 481 [1957].

⁹ O. WARBURG, G. KRIPPAHL, W. SCHRÖDER u. W. BUCHHOLZ, Z. Naturforschg. **9b**, 769 [1954]; O. WARBURG u. W. SCHRÖDER, Z. Naturforschg. **10b**, 639 [1955].

¹⁰ Vorschrift s. Z. Naturforschg. **10b**, 631 [1955].

¹¹ O. WARBURG, W. SCHRÖDER u. H. W. GATTUNG, Z. Naturforschg. **11b**, 654 [1956].

säure, wie in einer Arbeit mit GEWITZ und VOELKER gezeigt werden wird. Was die Wirkung des Lichts in diesen Zellen anbetrifft, so ist sie mindestens 10-mal geringer als in den andern Zellen, offenbar als Folge einer Gegenreaktion der Zellen gegen die Überbelichtung bei der Zucht. — Die x-Zellen sind als Versuchsmaterial nützlich, wenn man die Glutaminsäure in *Chlorella* ohne Zusatz von Fluorid zersetzen will. Wegen der Milchsäurebildung wird in diesen Zellen anaerob, ohne Fluorid, Glutaminsäure zersetzt, aerob wird die Glutaminsäure wieder aufgebaut.

Versuchsmedien. Für die Versuche wurden die Zellen aus der Kulturlösung in einfachere Medien übertragen, in die Salzlösungen S oder S*.

Salzlösung S. 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 5 g KH_2PO_4 + 4 g NaCl + 0,4 g NH_4Cl + 2 l Wasser + 0,6 cm³ n-H₂SO₄ · p_H 3,8.

Salzlösung S*. 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 5 g KH_2PO_4 + 2 l Wasser + 0,6 cm³ n-H₂SO₄ · p_H 3,8.

Salzlösungen 1/10 S oder 1/10 S*. Dies waren die Salzlösungen S oder S*, mit Wasser auf das 10-fache verdünnt. 1/10 S* wurde vielfach für papierchromatographische Versuche verwendet, bei denen ein höherer Salzgehalt stört. Dest. Wasser schädigt *Chlorella* und darf als Suspensionsmittel bei biologischen Reaktionen nicht verwendet werden. Wurden die stärkeren Salzlösungen S und S* bei papierchromatischen Versuchen verwendet, so wurde nach Ablauf der biologischen Reaktion zentrifugiert, die Salzlösung durch Wasser ersetzt, und 10 Min. auf 90° erhitzt und die überstehende Lösung eingetrocknet.

2. Glutaminsäure, manometrisch mit Zell-Trockenpulver

Chlorella, suspendiert in dest. Wasser, wurde in gefrorenem Zustand getrocknet. In dem Trockenpulver sind die Formen der Zellen erhalten, jedoch sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig und nicht mehr imstande, im Licht Kohlensäure zu reduzieren. Das Trockenpulver, suspendiert in Wasser oder Salzlösungen, decarboxyliert L-Glutaminsäure, nach unsern bisherigen Erfahrungen keine andern Aminosäuren, insbesondere nicht Asparaginsäure und auch nicht Brenztraubensäure. Es eignet sich deshalb zur Bestimmung von L-Glutaminsäure in Zellextrakten. Indem wir aus Zellextrakten mit Trockenpulver Kohlensäure entwickelten und mit Hilfe dieser Tests die Substanz isolierten, aus denen die Kohlensäure stammte, fanden wir, daß die Quelle der Kohlensäure Glutaminsäure ist. — Die Suspension des Trockenpulvers in Wasser wird durch 10⁻³-n. Blausäure inaktiviert, durch Erwärmen auf 70° schnell unwirksam.

Zur Bestimmung der Glutaminsäure brachten wir 20 mg Trockenpulver in die Birne eines kegelförmigen

Manometriegefäßes. Der Hauptraum enthielt 3 cm³ der zu bestimmenden Lösung. p_H nach Zugabe des Trockenpulvers war 5,0, die Temperatur war 20°, der Gasraum enthielt Argon. Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, bei dem die zugesetzten 4,8 µMole Glutaminsäure nach 50 Min. zur Hälfte zersetzt worden waren.

Abb. 1. Decarboxylierung der L-Glutaminsäure durch 20 mg *Chlorella*-Trockenpulver. 20°. Anaerob. p_H 3,8. I: 3 cm³ Salzlösung S. II: 3 cm³ Salzlösung S + 4,8 µMole L-Glutaminsäure.

Einer Erläuterung bedarf, warum ohne Zusatz von Glutaminsäure Kohlensäure entwickelt wird. Diese Kohlensäure stammt aus der Glutaminsäure des Trockenpulvers. Die Glutaminsäure ist in dem Trockenpulver fest gebunden und kann durch Wasser, sogar bei 100°, nur schwer extrahiert werden. Die so bestimmte Glutaminsäure betrug in 20 mg Trockenpulver 1 bis 1,5 µMole.

Beim Erhitzen frischer Zellen jedoch, die in Wasser oder Salzlösung suspendiert sind, wird die Glutaminsäure extrahiert und kann in solchen Extrakten mit *Chlorella*-Trockenpulver bestimmt werden. Gibt man vor dem Erhitzen Fluorid zu den Zellen, wäscht dann das Fluorid wieder fort und erhitzt dann die Zellen, so kann man zeigen, daß die Glutaminsäure durch das Fluorid zersetzt worden ist.

Zum Beispiel wurden 500 mm³ *Chlorella* in 3 cm³ Salzlösung S* suspendiert und 10 Min. auf 90° erhitzt. Dann wurde zentrifugiert und im überstehenden Hitzeextrakt die Glutaminsäure mit 20 mg Trockenpulver, wie im Versuch der Abb. 1, bestimmt. Wir fanden bei 20° in 275 Min. die folgenden Endwerte an Kohlensäure:

aus reiner Salzlösung	aus Hitzeextrakt	aus Hitzeextrakt, der mit $n/80\text{-F}$ 15 Min. vorbehandelt war
+28 mm ³ CO ₂	+210 mm ³ CO ₂ - 28 mm ³ CO ₂ +182 mm ³ CO ₂	+75 mm ³ CO ₂ -28 mm ³ CO ₂ +47 mm ³ CO ₂

Aus den 500 mm³ *Chlorella* waren also 7,3 μ Mole Glutaminsäure beim Erhitzen extrahiert worden, das ist

$$\frac{7,3 \cdot 0,147}{500 \cdot 0,225} 100 = 0,94\% \text{ des Zell-Trockengewichts.}$$

74% davon waren durch das Fluorid zersetzt worden.

3. Glutaminsäure, chromatographisch

Um die Glutaminsäure, ihren Zerfall und Wiederaufbau, chromatographisch zu bestimmen, wurde zu 100 mm³ *Chlorella*, suspendiert in 3 cm³ Salzlösung S, anaerob oder aerob Fluorid verschiedener Konzentration gegeben. p_H war immer 3,8, die Temperatur immer 20°. War die Glutaminsäure anaerob zersetzt oder hatte sich aerob der stationäre Zustand zwischen Zerfall und Wiederaufbau eingestellt, so wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 3 cm³ Wasser aufgewirbelt und 5 Min. auf 90° erwärmt. Dann wurde wieder zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit im Vakuum eingetrocknet, ein Teil, der

Abb. 2. Spaltung der Glutaminsäure in γ -Aminobuttersäure + CO₂ anaerob durch $n/1600$ - und $n/80$ -Fluorid. Aerob durch $n/80$ -Fluorid, aber nicht durch $n/1600$ -Fluorid.

5 mm³ Zellen entsprach, auf Papier aufgetragen, mit Phenol-Citrat-Phosphat entwickelt und mit Ninhydrin besprüht. Die Abb. 2, 3 und 4 zeigen einige Ergebnisse. In der Standardspalte sieht man in aufsteigender Folge Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin und γ -Aminobuttersäure.

Man beachte, daß man in keiner Abbildung eine deutliche Änderung der Konzentrationen der Asparaginsäure oder des Alanins sieht.

Abb. 3. Spaltung der Glutaminsäure in γ -Aminobuttersäure + CO₂ durch Erwärmen auf 45°. Bei 52° und 60° ist nichts zu sehen, weil die Aminosäuren bereits durch die Salzlösung extrahiert worden sind.

Abb. 4. $n/80$ -Fluorid in Argon oder Luft $\pm$ Blausäure. Die große Fluoridkonzentration $n/80$ zersetzt in Argon wie in Luft alle Glutaminsäure. 10^{-3} -Blausäure verhindert die Zersetzung anaerob wie aerob.

4. Glutaminsäure, manometrisch

Auf Grund der beschriebenen Versuche ist es unzweifelhaft, daß die labile Kohlensäure² der *Chlorella*, die sich bei Zusatz von Fluorid oder durch andere Maßnahmen entwickelt, aus der α -Decarboxylierung der Glutaminsäure stammt, so daß man die Glutaminsäure in *Chlorella* manometrisch bestimmen kann, indem man Fluorid zu lebender *Chlorella* gibt und die Entwicklung der Kohlensäure mißt. Dies ist eine große Vereinfachung gegenüber den Versuchen mit Zellextrakten und Trockenferment und auch gegenüber den chromatographischen Versuchen. Durch Zusatz von Fluorid zu lebenden Zellen haben wir die Möglichkeit, Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure im Leben hervorzurufen und dadurch über die Funktion der Glutaminsäure im Leben Auskunft zu erhalten.

Man muß dabei unterscheiden zwischen hohen und niedrigen Fluoridkonzentrationen. $n/80$ -Fluorid ist eine hohe Konzentration, es zersetzt die Glutaminsäure irreversibel und zersetzt deshalb anaerob und aerob die Glutaminsäure vollständig. Ordnet man dabei die Manometrie so an, daß v_F klein gegen v_G ist, so stört die Atmung in der kurzen Zeit der Glutaminsäurezersetzung nicht und man erhält dieselben Drucke an entwickelter Kohlensäure, ob der Gasraum Argon oder Luft enthält.

Kleinere Fluoridkonzentrationen, $n/1000$ bis $n/300$, zersetzen die Glutaminsäure reversibel und steigern außerdem die Atmung. Wenn die Bedingungen aerob sind, wird deshalb der Druck der entwickelten Kohlensäure in nicht übersehbarer Weise vermindert, so daß aerob die Glutaminsäure aus dem entwickelten Druck nicht bestimmt werden kann. Um trotzdem die aerobe Glutaminsäure-Zersetzung manometrisch zu messen, lassen wir zunächst die kleine Fluorid-Konzentration einwirken und zersetzen dann den Rest der Glutaminsäure durch viel Fluorid. Wenn z. B. $n/80$ -Fluorid aus 100 mm^3 Zellen, die mit Luft gesättigt sind, direkt 40 cm^3 Kohlensäure entwickelt, aber nach Einwirkung von $n/1000$ -Fluorid nur 30 mm^3 , so hat $n/1000$ -Fluorid $1/4$ der Glutaminsäure zersetzt. Man beachte, daß bei dieser Anordnung alles aerob geschieht und somit alle Einwände, die mit der anaeroben Milchsäurebildung zusammenhängen, fortfallen.

Bei der „aeroben“ Methode ist bei Sättigung mit Luft darauf zu achten, daß nach Schließen der Hähne nicht zu lange mit der Zugabe des Fluorids gewartet

wird. Andernfalls könnte es sein, daß infolge der Atmung der Kohlensäuredruck soweit steigt, daß sich merkliche Mengen an dissoziierender Kohlensäure in der *Chlorella* bilden (vgl. Abschnitt 6).

5. Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure

Während die Glutaminsäure anaerob durch sehr kleine Konzentrationen an Fluorid vollständig zersetzt wird, findet aerob eine Rückbildung von Glutaminsäure statt:

Indessen ist die Reaktion von rechts nach links keine einfache Rückreaktion, da die Reaktion anaerob vollständig in der Richtung der Zersetzung verläuft. Zur Rückreaktion, zum Wiederaufbau der Glutaminsäure, ist Sauerstoff, d. h. ist Atmung nötig und tatsächlich steigt die Atmung, wenn man aerob kleine Mengen Fluorid zu *Chlorella* hinzufügt. Zum Beispiel verbrauchten in 5 Min. 100 mm^3 *Chlorella*, suspendiert in 3 cm^3 Salzlösung S, bei 20° in Luft die folgenden Mengen an Sauerstoff, wenn sich im Einsatz der Manometriegefäße Kalilauge befand:

	2-tägige Südzellen [mm ³]	1-tägige A-Zellen [mm ³]
ohne F	10' —10	— 5,2
in $n/640\text{-F}$	10' —12,5	— 9,4
	10' —18,4	—11,4
	10' —17,9	—12,7

Die gleiche Konzentration an Fluorid, in der gleichen Salzlösung, die diese Steigerung der Atmung bewirkte, entwickelte aus *Chlorella* anaerob oder aerob die folgenden Mengen an Kohlensäure aus Glutaminsäure (Endwerte nach 20 Min. bei 20°):

	[mm ³]
anaerob durch $n/72\text{-F}$	42
anaerob durch $n/640\text{-F}$	42
anaerob durch $n/72\text{-F}$ nach $n/640\text{-F}$	0
aerob durch $n/72\text{-F}$	42
aerob durch $n/640\text{-F}$	nicht gemessen
aerob durch $n/72\text{-F}$ nach $n/640\text{-F}$	32,9
also aerob durch $n/640\text{-F}$	$42 - 31,9 = 9,1$

Das Ergebnis ist, daß $n/640$ Fluorid die Glutaminsäure anaerob zu 100%, aber aerob nur zu 21% zersetzt. Aus dem so gefundenen stationären Zustand zwischen Zersetzung und Wiederaufbau der Glutaminsäure und aus der Geschwindigkeit der anaeroben Zersetzung der Glutaminsäure kann man berechnen, daß aerob (in $n/640$ -Fluorid) pro Stunde das $2^{1/2}$ -fache Zellvolumen an Kohlensäure fixiert wird.

6. Dissoziierende Kohlensäure

Sättigt man *Chlorella* mit verschiedenen Kohlendruck und gibt dann Fluorid hinzu, so wird nicht nur Kohlensäure aus der Glutaminsäure entwickelt, sondern auch aus Bicarbonat, das durch Umsetzung mit Salzen schwacher Säuren entstanden ist, vielleicht auch aus Carbaminsäuren, die durch die Siegfriedsche Reaktion in *Chlorella* entstanden sind. Diese Kohlensäure ist abhängig vom Kohlendruck, während die aus Glutaminsäure entwickelte Kohlensäure unabhängig vom Kohlendruck ist.

Bei diesen Versuchen haben wir die bisher chemisch noch nicht erklärte Tatsache gefunden, daß aerob viel mehr Kohlensäure dissoziierend gebunden wird als anaerob. Wurden z. B. 100 mm³ 2-tägige Südzellen, die 1,84 μ Mole Chlorophyll enthielten und in 3 cm³ Salzlösung (pH 3,8) suspendiert waren, mit Kohlendruck von 1/20 bis 1/2 Atmosphäre gesättigt, so trieb n/80-Fluorid bei 20° in 20 Min. die folgenden Mengen an Kohlensäure aus (Endwerte):

CO ₂ -Druck [Atm]	0	1/20	1/10	1/5	1/2
Anaerob CO ₂ [mm ³] (CO ₂ -Argon)	38,8	44,7	48,2	51,8	56,3
Aerob CO ₂ [mm ³] (25 Vol.-Proz. O ₂)	38,0	51,5	63,0	79,5	97

Zieht man hier von den anaeroben Werten die aus Glutaminsäure beim CO₂-Druck Null entwickelte Kohlensäure ab, so erhält man die „anaerobe dissoziierende CO₂“; und zieht man von den aeroben Werten die anaeroben Werte ab, so erhält man diejenige CO₂, die nur unter dem Einfluß des Sauerstoffs gebunden wird und die wir die nur „aerob dissoziierende CO₂“ nennen wollen. Die beiden Subtraktionen ergeben:

CO ₂ -Druck [Atm]	1/20	1/10	1/5	1/2
Anaerob CO ₂ [mm ³]	5,9	9,4	13	17,5
Aerob CO ₂ [mm ³]	6,8	14,8	27,7	40,7

Das Ergebnis ist in Abb. 5 graphisch dargestellt. Man sieht, daß anaerob wie aerob der Sättigungswert bei einem CO₂-Druck von einer halben Atm erreicht wird; er ist für die nur aerob dissoziierende CO₂ 2 1/2-mal so groß, wie für die anaerobe dissoziierende CO₂.

Vergleicht man die Dissoziationskurven der nur aerob dissoziierenden CO₂ für verschieden gezüchtete *Chlorella*, so findet man große Unterschiede. 1-tägige A-Zellen — die die besten Quantenausbeuten

Abb. 5. Dissoziierende CO₂, durch n/80-Fluorid bei pH 3,8 und 20° aus *Chlorella* entwickelt. I: anaerob dissoziierende CO₂. II: nur aerob dissoziierende CO₂.

geben — binden die aerobe CO₂ fester, als 2-tägige Südzellen, die eine schlechtere Quantenausbeute geben. Zum Beispiel fanden wir die folgenden Sättigungsgrade der nur aerob dissoziierenden CO₂:

CO ₂ Druck [Atm]	1/20	1/10	1/5	1/2
% Sättigung in 1-täg. A-Zellen	65	72	84	100
% Sättigung in 2-täg. Südzellen	17	36	68	100

Eine weitere interessante Eigenschaft der nur aerob dissoziierenden Kohlensäure ist, daß der Sättigungswert gleich dem Glutaminsäuregehalt der Zellen ist. In dem Versuch der Abb. 5 betrug der Gehalt an Glutaminsäure 38,4 mm³, der Sättigungswert der nur aerob dissoziierenden CO₂ 41 mm³ CO₂, der Chlorophyllgehalt 41,2 mm³. Glutaminsäuregehalt, Chlorophyllgehalt und Sättigungswert der nur aerob dissoziierenden CO₂ waren also innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

Dieselben 3 Größen bestimmten wir für x-Zellen, die 5-mal soviel Glutaminsäure als Chlorophyll enthielten. Wir fanden in 100 mm³ x-Zellen:

	[μ Mole]
Sättigungswert der nur aerob dissoziierenden CO ₂ :	1,9
Glutaminsäure:	1,9
Chlorophyll:	0,418

In solchen Zellen also, in denen Chlorophyll- und Glutaminsäuregehalt verschieden sind, ist der Sättigungswert der nur aerob dissoziierenden CO₂ gleich dem Glutaminsäure- und nicht gleich Chlorophyllgehalt.

Anmerkung. Als wir den Einfluß des Sauerstoffs auf die dissoziierende CO₂ fanden, dachten wir zunächst, daß

der anaerobe Wert der dissoziierenden CO_2 kleiner gefunden wird, weil anaerob in der Sättigungszeit die gebildete Milchsäure bereits einen Teil der CO_2 austreibt. Durch Versuche mit 2-tägigen Südzellen, die anaerob nur sehr langsam Milchsäure bilden und durch Variation der Sättigungszeiten konnte dieser Einwand ausgeschlossen werden.

7. Glutaminsäure und Lichtwirkung

Bereits in unsrer vorigen Mitt.² haben wir beschrieben, wie man durch steigende Konzentrationen von Fluorid die Lichtwirkung in *Chlorella* in zunehmendem Maß hemmen kann. Wir können dieses Ergebnis heute so ausdrücken, daß mit zunehmendem Zerfall der Glutaminsäure die Lichtwirkung mehr und mehr gehemmt wird. Den Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und Lichtwirkung haben wir jetzt quantitativ untersucht, indem nach der Messung der Lichtwirkung der Rest an Glutaminsäure durch Zusatz von viel Fluorid gemessen wurde. So konnten wir für verschiedene (kleine) Konzentrationen an Fluorid Glutaminsäuregehalt und Lichtwirkung quantitativ vergleichen. Zum Beispiel fanden wir, wenn aerob mit $n/640$ - und $n/320$ -Fluorid der stationäre Zustand zwischen Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure hergestellt worden war:

Konzentration des Fluorids	Glutaminsäure- Rest [%]	Rest der Lichtwirkung [%]
$n/640$	79	82
$n/320$	36	36

wobei die Lichtwirkung, in 10 Vol.-Proz. CO_2 30 Vol.-Proz. O_2 , mit den Intensitäten $I = 430$ oder $I = 57 \text{ mm}^3$ Quanten pro Minute bestimmt wurde.

Den Einwand, das Fluorid hemme die Lichtwirkung nicht wegen der Zersetzung der Glutaminsäure, sondern aus andern Gründen, kann man ausschließen, indem man die Hemmung der Lichtwirkung durch ein und dieselbe Fluoridkonzentration anaerob und aerob vergleicht, z. B. durch $n/1000$ -Fluorid, das anaerob alle Glutaminsäure, aber aerob nur wenig Glutaminsäure zersetzt. Dann findet man, — bei der gleichen Fluoridkonzentration — anaerob eine sehr große und aerob eine sehr kleine Hemmung der Lichtwirkung.

Es lag daraufhin nahe zu prüfen, ob die Glutaminsäure beim Belichten von *Chlorella* abnimmt. Wir haben in keinem Fall eine Abnahme gefunden in Versuchen, in denen die Glutaminsäure nach langer

Verdunkelung oder nach Belichtung sowohl manometrisch mit Fluorid als auch chromatographisch bestimmt wurde.

8. Dissoziierende Kohlensäure und Lichtwirkung

Während die Glutaminsäure im Licht nicht abnimmt, fanden wir, daß die aerobe dissoziierende Kohlensäure im Licht sehr stark abnimmt. Die Versuche wurden mit 1-tägigen A-Zellen ausgeführt, von denen 100 mm^3 in 3 cm^3 Salzlösung S ($p_{\text{H}} 3,8$) suspendiert waren und die mit 20 oder 30 Vol.-Proz. CO_2 25 Vol.-Proz. O_2 gesättigt waren. Zum Beispiel entwickelte $n/80$ -Fluorid die folgenden Mengen an Kohlensäure:

aus verdunkelten Zellen	aus Zellen, die 2 Min. mit $J = 30 \text{ mm}^3$ Quanten/Min. belichtet worden waren
$90 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$	$73 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$

oder, wenn mit sehr hoher Intensität belichtet wurde

aus verdunkelten Zellen	nach 1 Min. $J = 800$	nach 5 Min $J = 800$
$77 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$	$62 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$	$49 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$

Die dissoziierende Kohlensäure nahm also bei Belichtung sehr erheblich ab. Wurden die im 2. Versuch verwendeten Zellen, nachdem sie 5 Min. mit der hohen Intensität $J = 800$ Quanten/Min. belichtet worden waren, verdunkelt und wurde dann nach verschiedenen Dunkelzeiten das Fluorid zu den Zellen gegeben, so entwickelte $n/80$ -Fluorid nach wachsenden Dunkelzeiten die folgenden Mengen an Kohlensäure:

Min.:	0	1	5	10	20	dunkel
$\text{CO}_2 [\text{mm}^3]$:	49	46	62	72	75	

Der Hellwert an dissoziierender CO_2 stieg also im Lauf von 20 Dunkelminuten wieder auf den ursprünglichen Dunkelwert.

Zusammengefaßt ist das Ergebnis der Versuche: Entwickelt man durch Belichtung vorher verdunkelter Zellen die Sauerstoffkapazität⁹ der *Chlorella*, so nimmt während der stöchiometrischen Sauerstoffentwicklung die dissoziierende Kohlensäure sehr stark ab. Im Dunkeln, in der Zeit, in der die induzierte Atmung die Sauerstoffkapazität wieder herstellt, steigt die dissoziierende Kohlensäure wieder auf ihren Anfangswert.