Dialysierte *Chlorella*, ein neues Versuchsmaterial zur Untersuchung der Photosynthese

OTTO WARBURG, GÜNTER KRIPPAHL UND ARNOLD LEHMANN

Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforsch. **23 b**, 1076—1079 [1968]; eingegangen am 4. Mai 1968)

Als neues Versuchsmaterial der Photosynthese wird dialysierte *Chlorella* beschrieben. Mit Hilfe der dialysierten *Chlorella* wurden zwei bisher unbekannte stöchiometrische Lichtreaktionen entdeckt, die Abspaltung von Kohlensäure aus der aeroben Kohlensäure, sowie die Umwandlung der aeroben Kohlensäuren in den Photolyten.

Wir berichten in dieser Arbeit über ein neues Versuchsmaterial, die „dialysierte *Chlorella*“, mit der es gelingt, *Chlorella* vollständiger von dem aktiven Mangan zu befreien, als es mit den früheren Methoden möglich gewesen ist. Wir berichten ferner über zwei bisher unbekannte stöchiometrische Lichtreaktionen, die wir mit Hilfe der dialysierten *Chlorella* entdeckt haben: über die Umwandlung der aeroben Kohlensäure in den Photolyten durch Licht sehr niedriger Intensität und über die Abspaltung der aeroben Kohlensäure durch Licht höherer Intensität, wobei Kohlensäure im Licht erscheint. Die Quantenausbeute dieser photochemischen Kohlensäureentwicklung betrug in den bisherigen Versuchen nahezu

$$\varphi = 0,5 \left[\frac{\mu\text{Mol CO}_2}{\mu\text{Mol abs. Lichtquanten}} \right].$$

Da *Chlorella* mit Hilfe von Sauerstoff etwa $1/20$ ihres Zellvolumens an aerober Kohlensäure binden und in den Photolyten umwandeln kann¹, so liegen hier zur Zellsubstanz stöchiometrische Reaktionen der Kohlensäure vor, die wegen der Größe ihres Umsatzes genau gemessen werden können.

1. Dialyse der *Chlorella*

Wir dialysieren *Chlorella*, die in $m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$ suspendiert ist, bei $+3^\circ\text{C}$ in bewegten Zellophan-schläuchen, an denen in 24 Stdn. 50 l $m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$ vorbeifließen.

Auf diese Weise dialysierte *Chlorella* ist nicht wesentlich geschädigt, wovon man sich durch Übertragung in Kulturlösung, der die Mikroelemente zugesetzt sind, überzeugen kann. Andererseits ist die dialysierte, in $m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$ suspendierte *Chlorella*

nicht imstande, im Dunkeln Photolyt zu bilden, obwohl ihre Fähigkeit zur Bildung aerober CO_2 erhalten ist. Mit Hilfe der Dialyse der *Chlorella* kann man also *Chlorella* gewinnen, in der die Umwandlung der aeroben CO_2 in Photolyten vollständig gehemmt ist. Zusatz von sehr wenig Mangansulfat zu der dialysierten *Chlorella* stellt die Fähigkeit zur Photolyt-bildung im Dunkeln sofort wieder her. Andere Mikroelemente, einzeln oder gemeinsam, waren wirkungslos, wenn das Mangan fehlte. Wirkungslos war auch Magnesiumsulfat in großen Mengen. 140 μMol Magnesiumsulfat, zu 100 mm³ *Chlorella* zugesetzt, konnten 0,1 μMol Mangansulfat bei der Photolyt-bildung nicht ersetzen.

Die 24-stdg. Dialyse der *Chlorella* extrahiert weder die löslichen Fermente noch die Aminosäuren der *Chlorella*, so daß die dialysierte *Chlorella* als Versuchsobjekt komplementär zu den 1944 eingeführten² mit Wasser gewaschenen Spinatgrana ist. Von beschallter *Chlorella* unterscheidet sich dialysierte *Chlorella* als Versuchsobjekt dadurch, daß sie CO_2 fixiert, während beschallte *Chlorella* die im Licht reduzierte CO_2 immer quantitativ zu CO_2 zurückoxydiert.

2. Spaltung der aeroben Kohlensäure durch Licht

Sättigt man dialysierte *Chlorella* 30 Dunkelminuten mit 10 Vol.-% CO_2 -Luft, so wird trotz des Mangankmangels die aerobe CO_2 gebildet, aber nichts davon wird in den Photolyten umgewandelt. Der Beweis ist, daß beim Übergang von dunkel zu hell zunächst kein O_2 erscheint.

Statt des O_2 jedoch erscheint beim Übergang von dunkel zu hell CO_2 , deren Endwert in dem Versuch der Abb. 1 in 2 Hellminuten erreicht ist. Die

¹ O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, Biochem. Z. **346**, 418 [1967]; **346**, 429 [1967]; Z. Naturforsch. **15 b**, 788 [1960].

² O. WARBURG u. W. LÜTTGENS, Naturwissenschaften **32**, 161, 301 [1944].

aerobe CO_2 , die im Verlauf des Versuchs durch Einkippen von Fluorid gemessen wurde, nahm dabei in dem Maß ab, als die entwickelte CO_2 zunahm, so daß also die CO_2 , die das Licht entwickelt, aus der aeroben CO_2 entwickelt wird.

Im ganzen war das Ergebnis derartiger Versuche, daß beim Übergang von dunkel zu hell aus der aeroben CO_2 nur CO_2 und aus dem Photolyten nur O_2 entwickelt wird; daß also aus einem Gemisch von aeroben CO_2 und Photolyt ein Gemisch von CO_2 und O_2 entwickelt wird. Auch aus nichtdialysierten Zellen, deren Mangan Gehalt normal ist, kann man Gemische von CO_2 und O_2 entwickeln, wenn man zu früh von dunkel zu hell übergeht. Zum Beispiel ist nach 10 Dunkelminuten die Hauptmenge der aeroben CO_2 bereits gebildet, aber die Umwandlung in den Photolyten ist noch nicht vollständig, so daß nach zu kurzer Dunkelheit Licht ein Gemisch von CO_2 und O_2 entwickelt.

3. Umwandlung der aeroben Kohlensäure in den Photolyten durch Licht

Wenn man die aerobe CO_2 in den dialysierten manganarmen Zellen durch Licht vollständig zersetzt hat und dann weiter belichtet, so beginnt alsbald eine Aufnahme von CO_2 und eine Entwicklung von O_2 , woraus hervorgeht, daß nunmehr im Licht Photolyt gebildet wird; während doch vorher, im Dunkeln, kein Photolyt gebildet worden war. Manganarme Zellen, die wegen ihrer Manganarmut im Dunkeln keinen Photolyt bilden können, sind also im Licht imstande, Photolyt zu bilden. Die graphische Darstellung eines derartigen Versuchs in Abb. 1 zeigt, wie nach 2 Hellminuten die Photolytbildung bereits beginnt.

Zur näheren Untersuchung der Erscheinung war es notwendig, Bildung und Spaltung des Photolyten zeitlich von einander zu trennen. Dies gelang, weil zur *Bildung* des Photolyten im Licht viel kleinere Lichtintensitäten genügen, als zur *Spaltung* des Photolyten. Abb. 2 zeigt, daß die aerobe CO_2 vollständig in Photolyt umgewandelt wird, wenn man in dialysierte manganarme Zellen 60 Min. eine Lichtintensität $J = 1,5 \text{ mm}^3$ Quanten pro Min. einstrahlt; während Abb. 1 zeigt, daß wir 50 mm^3 Quanten pro Min. einstrahlen, um den Photolyten zu spalten.

Bei beiden Lichtreaktionen, der *Bildung* des Photolyten und der *Spaltung* des Photolyten, haben wir bisher keinen spezifischen Einfluß der Wellen-

Abb. 1. *Chlorella*, suspendiert in $m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$, wurde bei $+3^\circ\text{C}$ 24 Stdn. dialysiert. Dann wurde bei 10°C der Stoffwechsel mit dem Gefäßpaar ungleichen Volumens gemessen. Das Volumen von Gefäß I war $17,86 \text{ cm}^3$, das Volumen von Gefäß II $33,69 \text{ cm}^3$, das Volumen der eingefüllten Zellsuspension $7,2 \text{ cm}^3 m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$, die je 100 mm^3 *Chlorella* enthielt, deren Chlorophyllgehalt etwa $1,2$ Mikromol betrug. Der Gasraum enthielt $10 \text{ Vol.}\%$ CO_2 -Luft. Aus diesen Daten ergibt sich die Berechnung von x_{O_2} und x_{CO_2} aus den beobachteten Druckänderungen H' und H

$$x_{\text{O}_2} = H' \times 4,035 - H \times 7,30 \text{ [mm}^3\text{]},$$

$$x_{\text{CO}_2} = -H' \times 5,33 + H \times 13,05 \text{ [mm}^3\text{]}.$$

Die Gefäße wurden zunächst 30 Dunkelminuten im Thermostaten zwecks Sättigung mit aeroben CO_2 geschüttelt. Dann wurden 50 mm^3 Quanten rotes Licht pro Min. eingestrahlt, die zu 90% absorbiert wurden. t_0 in der Abb. 1 ist die Zeit, zu der die Belichtung begann. Folgende Ablesungen wurden für die beiden ersten Hellminuten nach der Verdunkelung erhalten:

	Gefäß I H' [mm Brodie]	Gefäß II H [mm Brodie]
5' dunkel	-1	-0,5
1' d, 1' rot ($J=50$)	+3,0	+2,0
2,5' d	-1,5	-1,5
2,5' d	-1,5	-1,0
20' d	-4,5	-2,5
5' d	-1,5	-0,5
1' d, 2' rot ($J=50$)	+5,5	+3,0
2,5' d	-1,5	-1,5
2,5' d	-1,5	-1,0

und so weiter.

Die Abb. 1 zeigt, daß in den beiden ersten Hellminuten kein O_2 , sondern nur Kohlensäure entwickelt wird; daß aber bei weiterer Belichtung in einigen Hellminuten die normale Photosynthese entsteht, d. h. CO_2 -Absorption und O_2 -Entwicklung⁵.

längen gefunden. — Während die Bildung des Photolyten im Dunkeln eine Mangankatalyse ist, konnten wir bisher nicht entscheiden, ob auch die Bildung des Photolyten im Licht Mangan benötigt, oder nur weniger Mangan benötigt, als die Bildung

⁵ O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, Biochem. Z. **346**, 428 [1967].

Abb. 2. *Chlorella*, suspendiert in $m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$, wurde bei $+3^\circ\text{C}$ 40 Stdn. dialysiert. Dann wurde der Stoffwechsel mit dem Gefäßpaar ungleichen Volumens gemessen. Die Gefäße waren die gleichen, wie im Versuch der Abb. 1. Die gleiche *Chlorella*-Menge ($100\text{ mm}^3 = \sim 1,2\text{ }\mu\text{Mol Chlorophyll Zellen}$) suspendiert in $7,2\text{ cm}^3 m/50\text{-KH}_2\text{PO}_4$ wurde in jedes Gefäß eingefüllt. Anders als im Versuch der Abb. 1 enthielt der Gasraum 20 Vol.-% CO_2 -Luft und der Stoffwechsel wurde bei 20°C gemessen. Dann waren die Formeln zur Berechnung von x_{O_2} und x_{CO_2} aus den beobachteten Druckänderungen H' und H

$$x_{\text{O}_2} = H' \times 4,36 - H \times 8,36 [\text{mm}^3],$$

$$x_{\text{CO}_2} = -H' \times 5,45 + H \times 13,5 [\text{mm}^3].$$

Das Wesentliche des Versuchs war die verschiedene Vorbehandlung der Zellen, ehe mit Licht die aerobe CO_2 oder der Photolyt gespalten wurden, wobei zur Spaltung $4 \cdot 50\text{ mm}^3$ Quanten roten Lichts in 4 Min. eingestrahlt wurden. Die Vorbehandlung betrug immer eine Stde. und geschah entweder in Dunkelheit oder bei Einstrahlung von rotem Licht sehr niedriger Intensität. Wir fanden:

	Gefäß I H' [mm]		Gefäß II H [mm]	Ergebnis
1' d, 4' rot ($J=50$)	60' d	-26	-8	$x_{\text{O}_2} - 4$ $x_{\text{CO}_2} + 21$
	5' d	-1,5	-0,5	
	1' d	+4,5	+3,0	
	2,5' d	-2,0	-1,0	
	2,5' d	-1,5	-0,5	
1' rot ($J=1,5$), 4' rot ($J=50$), 1' rot ($J=1,5$)	55' rot ($J=1,5$)	-16	-5,0	$x_{\text{O}_2} + 19,5$ $x_{\text{CO}_2} - 16,1$
	5' rot ($J=1,5$)	-2	-0,5	
	1' rot ($J=1,5$)	+5,0	+1,5	
	2,5' rot ($J=1,5$)	-2,0	-0,5	
	2,5' rot ($J=1,5$)	-1,5	-0,5	
1' d, 4' rot ($J=50$)	55' d	-18	-5,5	$x_{\text{O}_2} - 1,4$ $x_{\text{CO}_2} + 17,7$
	5' d	-2	-0,5	
	1' d	+5,0	+3,0	
	2,5' d	-2,0	-1,0	
	2,5' d	-1,5	-0,5	

Das Ergebnis, das in der Abb. 2 graphisch dargestellt ist, zeigt, daß in 60 Dunkelminuten kein Photolyt gebildet wurde, sondern nur aerobe Kohlensäure; daß in den folgenden 60 Min., in denen $J=1,5\text{ mm}^3$ Quanten pro Min. eingestrahlt wurden, die normale Menge Photolyt gebildet wurde, so daß der

4-Min.-Test mit $J=50$ normale Photosynthese ergab; und daß in den darauf folgenden Dunkelminuten kein Photolyt gebildet wurde, so daß der Test mit $J=50$ nur CO_2 , keinen Sauerstoff entwickelte.

des Photolyten im Dunkeln. Auch die dialysierten manganarmen Zellen enthielten inner noch meßbare Mengen Mangan in 100 mm^3 *Chlorella*.

Die Tatsache, daß Licht den Photolyten nicht nur spaltet, sondern auch bildet, beseitigt einen Widerspruch³, der seit der Entdeckung des Photolyten existierte. 100 mm^3 normale *Chlorella* können im Dunkeln in 30 Min. nur etwa 25 mm^3 Photolyt bilden, während die gleiche Menge *Chlorella* bei Sättigung mit Licht in der gleichen Zeit etwa 1500 mm^3 O_2 entwickeln, also 1500 mm^3 Photolyt bilden kann. Die Maximalgeschwindigkeit der Photolytbildung im

Licht betrug also das 60-fache der Photolytbildung im Dunkeln. Durch die Entdeckung, daß Licht Photolyt nicht nur spaltet, sondern auch bildet, ist dieser Widerspruch nunmehr beseitigt.

4. Phenanthrolin⁴

Gleichgültig, ob Licht in intakter *Chlorella* oder in beschallter *Chlorella* oder in gewaschenen Spinatgrana O_2 entwickelt; gleichgültig, ob das Oxydant der energieliefernden Rückreaktion molekularer O_2 oder Ferricyankalium oder Benzochinon oder T.P.N.

³ Allgemeines über Luminofermente vgl. O. WARBURG, G. KRIPPAHL u. andere, Z. Naturforsch. **9b**, 769 [1954]; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **332**, 225 [1963], besonders S. 233.

⁴ O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, Ortho- und meta-Phenanthrolin in *Chlorella*. Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden. Georg Thieme, Stuttgart u. Interscience, New York 1962.

ist, immer wird die O_2 -Entwicklung im Licht durch $n/1000$ -*ortho*-Phenanthrolin vollständig und reversibel gehemmt. So schien es bisher, daß die Phenanthrolinhemmung spezifisch für die O_2 -Entwicklung im Licht sei.

Diese Auffassung muß nunmehr aufgegeben werden. Denn wir fanden, daß auch die CO_2 -Entwicklung aus aerober CO_2 im Licht durch $n/1000$ -Phenanthrolin vollständig und reversibel gehemmt wird; und daß auch die Umwandlung der aeroben CO_2 in den Photolyten durch $n/1000$ -Phenanthrolin vollständig gehemmt wird. Das gemeinsame aller dieser durch $n/1000$ -Phenanthrolin hemmbaren Lichtreaktionen ist eine katalytische Wirkung des belichteten Chlorophylls.

Da aber diese Katalysen durch viel weniger Phenanthrolin gehemmt werden, als sie Chlorophyll enthalten, so kann der Phenanthrolinhemmung keine Reaktion zwischen Chlorophyll und Phenanthrolin zugrundeliegen, sondern der Reaktionspartner des Phenanthrolins muß eine Substanz

sein, deren Menge klein ist gegen die Chlorophyllmenge, die inaktiviert wird. Diese Substanz könnte Mangan sein, dessen Komplex mit Phenanthrolin nach Versuchen von KRIPPAHL, BIRKICHT und STEVENS eine Bande im UV bei $344\text{ m}\mu$ hat, deren β -Wert $0,96\text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ beträgt, wenn der pH-Wert 6 und das Phenanthrolin in 10- bis 40-fachem Überschuß ist. Doch liegt ein Beweis zur Zeit noch nicht vor, obwohl wir nunmehr eine Mangankatalyse in *Chlorella* kennen, die durch Phenanthrolin antikatalytisch gehemmt wird, nämlich die Umwandlung der aeroben CO_2 in den Photolyten im Dunkeln *.

* Zum Nachweis dieser Antikatalyse des Phenanthrolins war eine Methode notwendig, um das Phenanthrolin schnell aus den gehemmten Zellen zu entfernen. Wir benutzten dazu Zinksulfat, das wir aus einer Birne in den Hauptraum eines Manometriegefäßes einkippten, in dem sich die *Chlorella* und das hemmende Phenanthrolin befanden. In wenigen Min. wird dann das Phenanthrolin als komplexes Zinksalz gebunden.