

Über den Einfluss des Kohlendruckes auf den Quantenbedarf der Photosynthese

OTTO WARBURG und GÜNTER KRIPPAHL

Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, Deutschland

Lässt man den Kohlendruck von 0.25 % einer Atmosphäre, bei dem Emerson im Jahr 1941 die Energieausbeute bei der Photosynthese gemessen hat, auf 5 % einer Atmosphäre steigen — das ist der Kohlendruck, bei dem in Dahlem die Energieausbeute gemessen worden war — so steigt die Energieausbeute auf das 4-fache. Die schlechten Energieausbeuten, die Emerson bei der Nachprüfung der Dahlemer Arbeiten im Jahr 1941 erhielt und die James Franck im Jahr 1941 als die thermodynamisch maximal möglichen erklärte, waren also die Folge davon, dass Emerson bei der Nachprüfung der Dahlemer Arbeiten einen Kohlendruck anwandte, der 20-mal niedriger war, als bei den Dahlemer Arbeiten und der auch 20-mal niedriger war, als der Kohlendruck, bei dem sowohl wir in Dahlem als auch Emerson in Urbana die zu den Versuchen verwendete *Chlorella* gezüchtet hatten.

Eine neue Methode zur Messung der Energieausbeute bei der Photosynthese ist für die Zwecke dieser Arbeit entwickelt worden.

Da der Quantenbedarf der Photosynthese das Fundament ist, auf dem heute in Dahlem die Chemie der Photosynthese aufgebaut wird, haben wir eine kürzlich zur Messung des Quantenbedarfs eingeführte¹ Ein-Gefässmethode weiterentwickelt, die darauf beruht, dass in gesonderte Abteile der Manometriegefässe konzentrierte Bicarbonat-Carbonatgemische eingefüllt werden, die definierte Kohlendrucke erzeugen und sie konstant halten.

Ein geeignetes Manometriegefäss ist in Fig. 1 abgebildet. Der Hauptraum enthält wenig *Chlorella* (3 mm³), die in viel Flüssigkeit (7 cm³ Kulturlösung, pH 4,3) suspendiert ist; der Anhänger enthält 3-molare Bicarbonat-Carbonatgemische; der Gasraum enthält anfangs Luft und nach kurzem Schütteln denjenigen Kohlendruck, der der Gleichgewichtsdruck des Bicarbonat-Carbonatgemischs im Anhänger ist. Damit sich dieses Gleichgewicht schnell einstellt, gibt man vor Schluss der Hähne in den Anhänger einige mg des Ferments *Carbonylase*, das die Reaction der Kohlensäure mit Wasser katalysiert. So wird der Kohlendruck in den Manometriegefässen durch die Bicarbonat-Carbonatgemische konstant gehalten, und es können Druckänderungen, die bei Belicht-

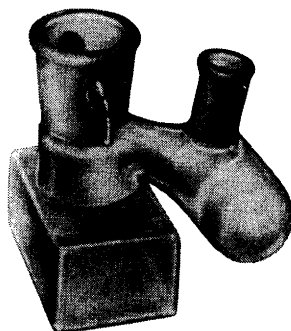


Fig. 1. Manometriegefäß zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese mit der Ein-Gefäßsmethode. (Fecit Peter Ostendorf). Gesamtvolumen 25,9 cm³. Im Hauptraum 7,0 cm³ Zellsuspension, im Anhänger 3,2 cm³ 3-molares Bicarbonat-Carbonatgemisch und zwar:
85 Bicarb. + 15 Carbonat zur Erzeugung des CO₂-Drucks 4,7 % einer Atmosphäre
40 Bicarb. + 60 Carbonat „ „ „ „ 0,24 % einer Atmosphäre

$$k_{O_2}^{20} = 1,5 \text{ mm}^2; k_{CO_2}^{20} = 2,354 \text{ mm}^2.$$

ung auftreten, nur Änderungen des Sauerstoffdrucks sein. Dann kann die Sauerstoffentwicklung im Licht nach der Formel

$$x_{O_2} = h_{O_2} \cdot k_{O_2}$$

berechnet werden.

Bei der Bestimmung des Quantenbedarfs brennt über dem Thermostaten ununterbrochen eine "Tageslichtlampe", deren Licht das ganze Manometriegefäß diffus ausleuchtet und so schwach ist, dass es die Atmung der 3 mm³ Zellen gerade kompensiert. Zur Messung des Quantenbedarfs wird dem diffusen sehr schwachen blaugrünen Licht ein Lichtinkrement hinzugefügt, ein roter Lichtstrahl, dessen Quantenintensität bolometrisch gemessen ist und der durch den Boden des Manometriegefäßes vertikal in die Zellsuspension eindringt. Der von den Zellen absorbierte Bruchteil dieses Strahls wird in der Ulbricht'schen Kugel gemessen, in deren Mittelpunkt² die Manometriegefäße bestrahlt und bewegt werden, wie bei der Messung des Quantenbedarfs. So erhält man, mit Hilfe eines Manometriegefäßes, auf sehr einfache Weise und sehr genau den Quantenbedarf der Sauerstoffentwicklung bei der Photosynthese

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\text{Mole Quanten absorbiert}}{\text{Mole Sauerstoff entwickelt}}$$

Zur Bestimmung des Quantenbedarfs werden nur junge *Chlorella*-Kulturen benutzt, deren Züchtungsbedingungen im experimentellen Teil angegeben sind und beachtet werden müssen. Zur Schonung werden die geernteten Zellen nicht zentrifugiert, sondern lediglich vor dem Einbringen in die Manometriegefäße auf die Konzentration 3:7000 mm³ verdünnt. Dann wachsen die Zellen in den bewegten Manometriegefäßen während der Bestimmung der Quantenausbeuten. Durch mehrfache Messungen der Lichtabsorption im Fortschritt der Versuche, die beliebig lange dauern können, haben wir dem Wachstum der Zellen Rechnung getragen, wie es in Protokoll 2 beschrieben ist.

Es ist bemerkenswert, dass bei dieser Versuchsanordnung trotz relativ hoher Lichtintensitäten gute Ausbeuten erhalten werden. Zum Beispiel war bei 9-facher Überkompensation der Atmung durch das rote Lichtinkrement der Quantenbedarf $1/\Phi = 3,8$, bei 14-facher Überkompensation $1/\Phi = 4,6$ und bei 20-facher Überkompensation $1/\Phi = 6,8$, was wahrscheinlich damit zusammenhängt, dass bei der geringen Zelldichte alle Zellen hinreichend blaugrünes Licht³ erhalten. Jedenfalls verschwinden bei unserer Versuchsanordnung die Unsicherheiten, die mit der Ruheatmung der Zellen zusammenhängen; und die Sauerstoffentwicklung im Licht, zu der wegen der Kompensation der Atmung keine Dunkelatmung zu addieren ist, liegt ganz im positiven und ist ein sicheres Mass des Energiegewinns.

Die neue Versuchsanordnung ist besonders geeignet zur Untersuchung des Einflusses des Kohlensäuredrucks auf den Quantenbedarf. Denn um den Kohlensäuredruck zu variieren, hat man nur nötig, die Zusammensetzung der Bicarbonat-Carbonatgemische in den Anhängern zu variieren, während man alles andere konstant lässt. Es ist ein weiterer methodischer Fortschritt, dass man nunmehr, trotz eines grossen chemischen Verbrauchs an Kohlensäure in den belichteten Manometriegefässen, den Einfluss sehr kleiner Kohlensäuredrucke auf den Quantenbedarf untersuchen kann, da die im Licht verbrauchte Kohlensäure aus dem grossen Kohlensäurevorrat der Puffergemische der Anhänger schnell ersetzt wird.

Zwei Kohlensäuredrucke waren es, die uns besonders interessierten: der Kohlensäuredruck von etwa 5% einer Atmosphäre (500 mm Wasser), das ist der Kohlensäuredruck, bei dem *Chlorella* am besten wächst und bei dem sie nach unsern Vorschriften überall gezüchtet wird. 5% einer Atmosphäre ist auch der Kohlensäuredruck, bei dem wir im Jahr 1923 in Dahlem die ersten Messungen des Quantenbedarfs der Photosynthese durchgeführt haben⁴. Der zweite Kohlensäuredruck, der uns interessierte, war der Kohlensäuredruck von 0,25% einer Atmosphäre (25 mm Wasser), bei dem Emerson⁵ im Jahr 1941 in den U. S. A. den Quantenbedarf der Photosynthese gemessen hat.

In der Tabelle 1 und den Figuren sind einige Versuche beschrieben, bei denen der Dahlemer Kohlensäuredruck und Emersons Kohlensäuredruck gegeneinander

Tabelle 1. Quantenbedarf der Photosynthese bei variierten Kohlensäuredrucken.

CO ₂ - Druck mm Brodie	mm ³ Quanten pro Minute eingestrahlt	$\frac{1}{\Phi} =$ $\frac{\text{Quantenbedarf}}{\text{mm}^3 \text{ Quanten absorbiert}}$ mm ³ O ₂
470	7	3,78
470	15	3,92
470	24	4,60
470	31	5,0
470	50	6,8
24	15	16
24	24	14
24	31	16

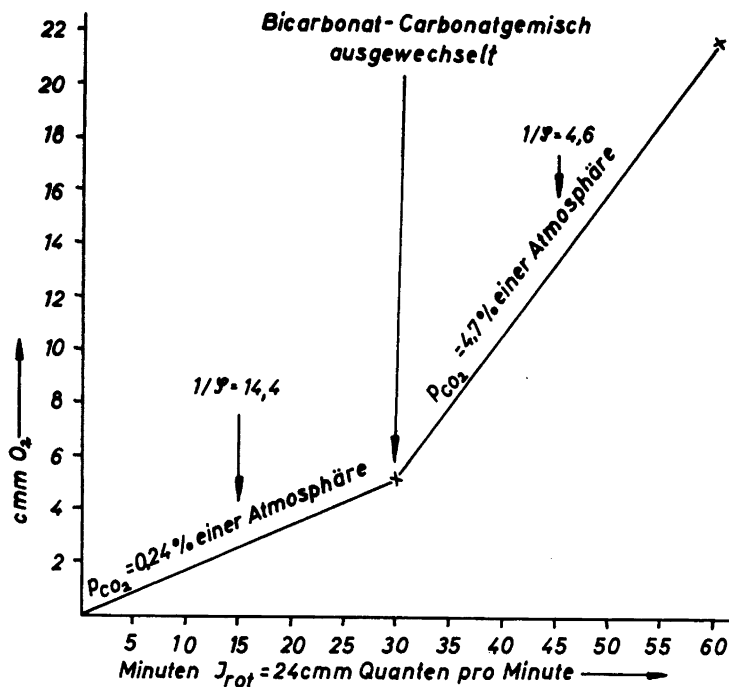


Fig. 2. Messung des Quantenbedarfs bei variierten Kohlendruck. Zuerst 0,24 %, dann 4,7 % einer Atmosphäre, erzeugt mit Bicarbonat-Carbonatgemischen im Anhängergefäß nach Figur 1. Berechnung des Quantenbedarfs Protokoll 1. Auch ohne Rechnung sieht man aus der Fig., dass die Sauerstoffentwicklung auf das 4-fache steigt, wenn man Emersons Kohlendruck durch den Dahlemer Kohlendruck ersetzt. Der niedrige Kohlendruck ist Emersons Kohlendruck, der höhere Kohlendruck ist der Dahlemer Kohlendruck.

ausgetauscht wurden, während alles andere konstant blieb. Wie man sieht, stieg die Sauerstoffentwicklung auf das 4-fache (Fig. 2), wenn man von Emersons Kohlendruck auf den Dahlemer Kohlendruck überging; und die Sauerstoffentwicklung sank auf $\frac{1}{4}$ (Fig. 3), wenn man von dem Dahlemer Kohlendruck auf Emersons Kohlendruck überging.

Bekanntlich hat J. Franck⁶ die niedrigen Ausbeuten Emersons bei dem Kohlendruck von 0,25 % einer Atmosphäre für die maximal möglichen gehalten und deshalb die Dahlemer Ausbeuten, die bei einem 20-mal höheren Kohlendruck gemessen worden waren, für falsch erklärt.

1948 bestätigten wir die Dahlemer Ergebnisse bei dem Kohlendruck von 5 % einer Atmosphäre in gemeinsamen Versuchen mit amerikanischen Gelehrten⁷ in Urbana, Bethesda und Woods Hole. Später wiederholten wir unsere Versuche in Dahlem bei jedem Fortschritt der Methoden und bestätigten sie von neuem⁸. Aber alle bisherigen Methoden übertrifft die hier beschriebene Ein-Gefäßsmethode an Einfachheit und Überzeugungskraft. Nunmehr kann jeder, der fähig

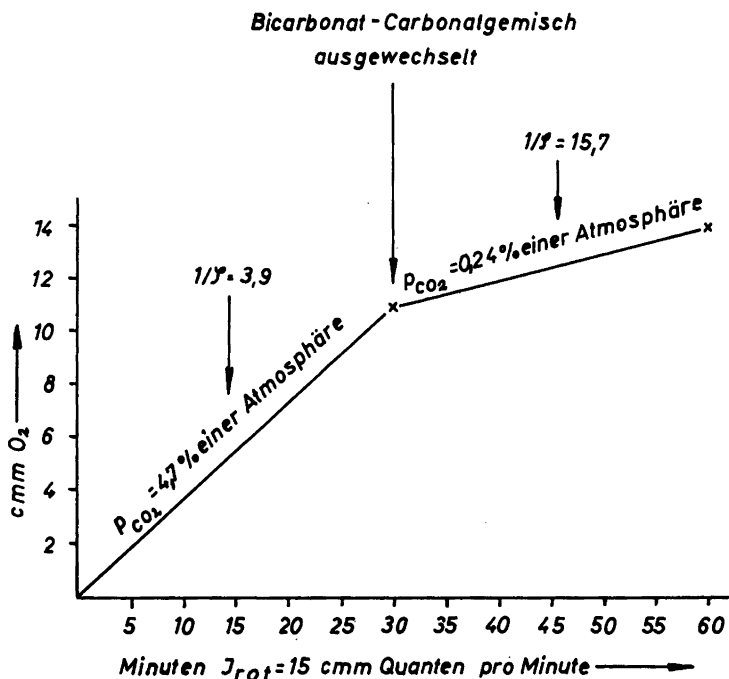


Fig. 3. Messung des Quantenbedarfs bei variierten Kohlendruckdrücken. Zuerst bei 4,7 % und dann bei 0,24 % einer Atmosphäre. Berechnung des Quantenbedarfs in Protokoll 2. Auch ohne Rechnung sieht man aus der Figur, dass die Sauerstoffentwicklung auf $\frac{1}{4}$ sinkt, wenn man den Dahlemer Kohlendruck durch Emersons Kohlendruck ersetzt. Der niedrige Kohlendruck ist Emersons Kohlendruck, der höhere Kohlendruck ist der Dahlemer Kohlendruck.

ist, ein Manometer abzulesen, am Manometer *sehen* – und wäre er unfähig, eine Messung oder eine Rechnung auszuführen – wie die Sauerstoffentwicklung einer gegebenen *Chlorellasuspension* auf das 4-fache steigt, wenn man Emersons Kohlendruck durch den Dahlemer Kohlendruck austauscht, während alles übrige konstant bleibt. "In den Naturwissenschaften", sagt Pasteur, "ist die Zeit der oberste Richter."

Experimentelle Einzelheiten

Chlorella pyrenoidosa wurde in Kulturlösung K + Microelementen suspendiert⁹ und in 250 cm³ Kulturkolben unter Durchleitung von 5 Vol % CO₂-Luft bei 25 °C im Licht einer 160 Watt Xenon-Hochdrucklampe bei 20 cm Abstand gezüchtet. Die Einsaat war 60 mm³ Zellen, die Ernte nach 24 Stunden war 200 mm³. Zum Versuch wurden die Zellen nicht zentrifugiert, sondern mit Kulturlösung K (ohne Microelemente) auf 3 mm³ : 7000 mm³ verdünnt. Je 7,0 cm³ dieser Suspension wurde in die Gefäße Fig. 1 eingefüllt. Die Temperatur des Mess-Thermostaten war 20 °C.

Eine 100-Watt Tageslichtlampe brannte ununterbrochen während der Versuche, die beliebig lange dauern konnten, über dem Thermostaten in einem Abstand von den Manometriegefäßen,

der so reguliert wurde, dass die Atmung der Zellen gerade kompensiert war. Der hierzu erforderliche Lampenabstand nahm in der ersten Zeit dauernd zu, das heisst, die Lichtwirkung nahm dauernd zu; erst wenn sie konstant geworden war, begann die Messung des Quantenbedarfs — der Zusatz des Lichtinkrements und die dadurch bewirkte Messung der Sauerstoffentwicklung. Das Lichtinkrement war ein roter Lichtstrahl des Bezirks 645 $m\mu$, der bolometrisch gemessen war und aus dem Licht einer 500 Watt Xenonhochdrucklampe isoliert war durch 5 cm fließendes Wasser, 2 cm 2 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und eine Interferenzscheibe. Die Konstanz der am Konstanthalter brennenden Lampe wurde während der Versuche durch einen abgezweigten Lichtstrahl kontrolliert, dessen Photostrom mit einem Silica-Element von Bruno Lange gemessen wurde.

Protokoll 1. Versuch vom 17.4.62. 3 mm^3 *Chlorella* in 7,0 cm^3 Kulturlösung pH 4,3 im Hauptraum, 3,0 cm^3 3-molares Bicarbonat-Carbonat 40 + 60 und 2 mg *Cartase* in 0,2 cm^3 H_2O im Anhänger, sodass der CO_2 -Druck = 24 mm Brodie. Gasraum dann 0,24 % CO_2 -Luft. Wellenlänge 645 $m\mu$, von der die Zellen 10,5 % absorbieren.

Licht-Intensität	$k_{\text{O}_2}^{20} = 1,5 \text{ mm}^2$	
T(ageslicht)	5'	0 } mm
T	5'	0 } "
T + J ₆₄₅ = 24	60'	+10 } $60' : +10 - 3 = +7 \text{ mm} = 10,5 \text{ mm}^3$
T - -	10'	+1 } $\frac{1}{\Phi} = \frac{60 \times 24 \times 0,105}{10,5} = 14,4$
T - -	10'	+1 }
T + J ₆₄₅ = 24	15'	+3,0 } $30' : +6,5 - 3 = +3,5 \text{ mm} = 5,25 \text{ mm}^3$
" " "	15'	+3,5 } $\frac{1}{\Phi} = \frac{30 \times 24 \times 0,105}{5,25} = 14,4$
T - -	10'	+1 }
T - -	10'	+1 }

Nummehr Gemisch 40 + 60 im Anhänger ausgetauscht gegen Gemisch 85 + 15, sodass CO_2 -Druck 470 mm Brodie und Gasraum dann 4,7 % CO_2 -Luft.

$k_{\text{O}_2}^{20} = 1,5 \times 1,04 = 1,56 \text{ mm}^2$		
T	5'	+1 mm
T	10'	0 } $30' : +10,5 - 0 = 10,5 \text{ mm} = 16,4 \text{ mm}^3$
T + J ₆₄₅ = 24	15'	+5,0 } $\frac{1}{\Phi} = \frac{30 \times 24 \times 0,105}{16,4} = 4,6$
" " "	15'	+5,5 }
T - -	10'	0 } $10' : +5,0 - 0 = 5,0 \text{ mm} = 7,8 \text{ mm}^3$
T + J ₆₄₅ = 50	5'	+2,5 } $\frac{1}{\Phi} = \frac{10 \times 50 \times 0,105}{7,8} = 6,75$
" " "	5'	+2,5 }

Die Atmung der 3 mm^3 Zellen war in 30 Min -1,2 mm^3 O_2 , die O_2 -Entwicklung im Licht bei J = 24 war +16,4 mm^3 , die Atmung war also durch den roten Lichtstrahl 13,6-fach überkompensiert. Bei J = 50 war die Atmung nach der entsprechenden Rechnung 19,5-fach überkompensiert.

Protokoll 2. Versuch vom 28.6.62. Anordnung wie in dem Versuch Protokoll 1, nur wurden andere Intensitäten des roten Lichtstrahls angewandt und die Reihenfolge der Kohlendrucke war umgekehrt, zuerst der hohe und dann der niedrige Kohlendruck.

Gasraum 4,7 %		CO ₂ -Luft.		$k_{O_2^{20}} = 1,56 \text{ mm}^2$		Absorption 645m μ =9,5 %	
T(ageslichtlampe)	15'	0	} mm				
T + J ₆₄₅ = 15	5'	vor					
T „ „	15'	+ 3,5	} $30' + 8 - 1 = 7 \text{ mm} = 10,9 \text{ mm}^3.$	$\frac{1}{\bar{\Phi}} = \frac{30 \times 15 \times 0,095}{10,9} = 3,92$			
T „ „	15'	+ 4,5					
T - -	5'	vor					
T - -	15'	+ 1					
T + J ₆₄₅ = 31,2	5'	vor					
T + J ₆₄₅ = 31,2	15'	+ 6,5	} $30' + 14 - 2 = 12 \text{ mm} = 18,7 \text{ mm}^3.$	$\frac{1}{\bar{\Phi}} = \frac{30 \times 31,2 \times 0,10}{18,7} = 5,0$			
T „ „	15'	+ 7,5					
T - -	5'	vor					
T - -	15'	+ 1,0					
T + J ₆₄₅ = 7,0	5'	vor					
T „ „	60'	+ 11,5	} $60' + 11,5 - 4 = 7,5 \text{ mm} = 11,7 \text{ mm}^3.$	$\frac{1}{\bar{\Phi}} = \frac{60 \times 7 \times 0,105}{11,7} = 3,78$			
T - -	5'	vor					
T - -	15'	+ 1					

Nummehr Gasraum 0,24 % CO₂-Luft. $k_{O_2^{20}} = 1,50 \text{ mm}^2$. Absorption 645 m μ = 10,5 %

T - -	15'	+ 1	} $30' + 3 - 1 = 2 \text{ mm} = 3 \text{ mm}^3.$	$\frac{1}{\bar{\Phi}} = \frac{30 \times 15 \times 0,105}{3} = 15,7$			
T + J ₆₄₅ = 15	15'	vor					
T „ „	30'	+ 3					
T - -	5'	vor					
T - -	15'	0					
T + J ₆₄₅ = 31,2	5'	vor	} $30' + 5,0 - 0,5 = 4,5 \text{ mm} = 6,75 \text{ mm}^3.$	$\frac{1}{\bar{\Phi}} = \frac{30 \times 31,2 \times 0,115}{6,75} = 15,9$			
T „ „	30'	+ 5					
T - -	5'	vor					
T - -	15'	+ 0,5					Endabsorption 11,5 %

Die Lichtabsorption richtig gezüchteter Zellen in dem Manometriegefäß soll für 3 mm³ Zellen auf einer Fläche von 8 cm² nicht mehr als etwa 10 % betragen; bei wesentlich höheren Chlorophyllgehalten sind die Ausbeuten schlechter. Die Lichtabsorption wurde mit der Ulbricht'schen Kugel, wie in der Einleitung erwähnt, gemessen².

Die Kohlendrucke in den Gefäßen wurden erzeugt durch 3 cm³ 3-molare Bicarbonat-

Carbonatgemische in dem Anhänger. Die mathematische Theorie¹⁰ der Ein-Gefässmethode kann in die Gleichung zusammengefasst werden

$$K_{O_2} = k_{O_2} \times \left[\frac{R}{k_{CO_2}} \right] \left[\frac{R}{k_{CO_2} + \gamma \times k_{O_2}} \right]$$

wo K_{O_2} die Gefässkonstante für Sauerstoff für beliebige Werte der Retention r der Kohlensäure bedeutet, während k_{O_2} die einfache Gefässkonstante für Sauerstoff und der eingeklammerte Ausdruck die Korrektion ist, mit der k_{O_2} zu multiplicieren ist, um K_{O_2} zu erhalten. Praktischen Wert hat die Einfässmethode nur dann, wenn der eingeklammerte Ausdruck sich dem Wert 1 nähert. Bei den beiden von uns angewandten Kohlensäuredrucken von 24 und 470 mm Brodie ist die Retention $R = 3 \times r$ so gross, dass $K_{O_2} = k_{O_2} \times 1$ für den CO_2 -Druck 24 mm und $K_{O_2} = k_{O_2} \times 1.04$ für den CO_2 -Druck 470 mm Brodie ist.

In den Protokollen 1 und 2 bedeutet "T" Tageslichtlampe, die während der ganzen Dauer der Versuche ununterbrochen brannte, J bedeutet die Quantenintensität in mm^3 Quanten pro Minute des eingestrahnten roten Lichtstrahls der Wellenlänge $645 m\mu$, α ist der von den Zellen absorbierte Bruchteil dieses Strahls. Waren durch den Strahl in t Minuten $x_{O_2} mm^3$ Sauerstoff entwickelt worden, so war der Quantenbedarf der Sauerstoffentwicklung

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{t \times J \times \alpha}{x_{O_2}}$$

Nach Zugabe oder Fortnahme des roten Lichtstrahls wurde meistens 5 Minuten bis zur Einstellung des neuen stationären Zustands gewartet. Erst dann begann die Messung des Quantenbedarfs.

LITERATUR

1. Warburg, O. *Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden*, Georg Thieme, Stuttgart und Interscience, New York. 1962. Im folgenden als "Weiterentwicklung" citiert.
2. "Weiterentwicklung", S. 237.
3. "Weiterentwicklung", S. 248 und 261.
4. Warburg, O. und Negelein, E. *Z. Physik. Chem. (Leipzig)* **102**, 236, 1922 und **106**, 191, 1923.
5. Emerson, R. und Lewis, C. M. *Am. J. Botany*, **28** (1941) 789.
6. Franck, J. und Gaffron, H. *Advan. Enzymol.*, **1**, 199, 1941.
7. "Weiterentwicklung", S. 75 bis 128 (gemeinsam mit Dean Burk).
8. "Weiterentwicklung", S. 248, 261, 414, 447, 484, 578, 582.
9. "Weiterentwicklung", S. 452.
10. "Weiterentwicklung", S. 578.

Eingegangen am 5. Februar 1963.