

deren traten diese Kunstprodukte bei solchen fluoreszierenden Antiseren auf, die bakteriell zersetzt waren bzw. häufig aufgetaut und wieder eingefroren wurden.

Die Ratte, die eine physiologische Proteinurie aufweist¹⁹, zeigte auffallenderweise in den Nieren trotz der in den Epithelien des Tubulus contortus I häufig histologisch sichtbaren hyalinen Eiweißgranula kein nachweisbares homologes Albumin. Der Befund ist nur so zu erklären, daß die nachweisbare Proteinspeicherung kein Serumprotein ist oder daß dieses, wie wir annehmen möchten, intrazellulär bereits seine spezifische Antigenstruktur verloren hat. MAYERSBACH und Mitarbb.¹⁰ sind in ihren Untersuchungen mit heterologen Proteinen ebenfalls zu der Ansicht gelangt, daß diese rasch ihre Antigenstruktur verlieren. Außerdem muß an die von GITLIN und Mitarbb.³ geäußerte Möglichkeit gedacht werden, daß durch Komponenten des Cytoplasmas keine Fluoreszenz angeregt werden kann.

¹⁹ S. B. GILSON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **72**, 608 [1949].

Der Nachweis der Serum-Proteine in der Leber und die verschiedene Lokalisation der Farbstoffspeicherung bestätigt wieder unsere früheren, methodisch auf andere Weise erhaltenen Befunde¹², wonach die Serumproteine auf den Speichertyp in der Leber keinen Einfluß haben. Der Nachweis einer vermehrten Serum-Proteinspeicherung der Niere¹¹ nach Trypanblauinjektion konnte mit der angewandten Methode nicht erbracht werden. Der Grund hierfür kann in der oben vermuteten Aufhebung der immunologischen Spezifität des heterologen Albumins in der Tubulusepithelzelle beruhen. Weiter stört bei der Beurteilung der Grünfluoreszenz die starke rotviolette Fluoreszenz von Trypanblau bzw. die Löschung von Fluoreszenz durch Lithiumkarmin.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für ihre Unterstützung zu größtem Dank verpflichtet. Herrn Prof. H. BENNHOLD gebührt unser Dank für die wohlwollende Förderung. Herr Prof. Dr. H. FRIEDRICH-FREKSA stellte uns entgegenkommenderweise Einrichtungen des Max-Planck-Institutes für Virusforschung zur Verfügung, wofür wir ihm herzlichst danken. Fräulein B. SCHÜTT assistierte vorbildlich.

Verfolgung der Bildung reduzierender Substanzen mit Hilfe der elektrochemischen H_2O_2 -Meßmethode an inkubierter *Chlorella pyrenoidosa* im Hellen und im Dunkeln

Von K. DAMASCHKE

Aus der Bundesanstalt für Materialprüfung, Berlin-Dahlem
(Z. Naturforschg. **12 b**, 150—155 [1957]; eingegangen am 27. November 1956)

Da bei der elektrochemischen H_2O_2 -Messung nicht nur H_2O_2 , sondern die Summe der reduzierenden Stoffe angezeigt wird, lag es nahe, die Bildung dieser Stoffe in Chlorellasuspensionen unter den verschiedensten Bedingungen zu untersuchen. Es wurde erst einmal grundsätzlich festgestellt, daß während der Lichteinwirkung reduzierende Stoffe gebildet werden. Die Bildung derselben wurde dann bei verschiedenen CO_2 -Gehalten und nach verschieden langer Inkubationszeit verfolgt. Es zeigte sich, daß die Menge der gebildeten reduzierenden Stoffe mit der Länge der vorangegangenen Inkubationszeit ansteigt. Die im Licht gebildeten reduzierenden Stoffe wurden ebenfalls im Licht wieder zersetzt. Ist dies geschehen, setzt die Photosynthese ein. Die dabei entstehenden O_2 -Konzentrationsänderungen werden ebenfalls elektrochemisch gemessen. Während der Dunkelzeit werden geringe Mengen eines reduzierenden Stoffes gebildet. Die Bildung der reduzierenden Stoffe während der Hellzeit ist durch *o*-Phenanthrolin hemmbar.

Methodik

Der Sauerstoff wurde elektrochemisch nach TÖDT^{1,2,3,4} mit der Elementkombination Goldamalgam gegen Zink gemessen. Diese Methode hat gegenüber der Mano-

metrie den Vorteil, daß man ohne Verzögerung den gelösten Anteil des Sauerstoffs in einer Lösung bestimmen und ihn registrierend verfolgen kann. Vor allem kann man genaue Aussagen darüber machen, welche O_2 -Konzentration in der Lösung besteht, was bei der

¹ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Biochem. Z. **326**, 424 [1955].

² W. SCHWARZ, Werkstoffe u. Korrosion **11**, 527 [1955].

³ F. TÖDT, Angew. Chem. **67**, 266 [1955].

⁴ F. TÖDT, K. DAMASCHKE u. L. ROTHBÜHR, Biochem. Z. **325**, 210 [1954].

Manometrie nicht möglich ist, ganz abgesehen von der höheren Empfindlichkeit der elektrochemischen O_2 -Meßmethode bei niedrigen O_2 -Konzentrationen. Aus den geschriebenen Kurven ist es ohne weiteres möglich, die Kinetik einer Reaktion abzulesen.

Die Messung des H_2O_2 auf elektrochemischem Wege nach WINKELMANN⁵ erfolgt ähnlich, wie die O_2 -Messung nach TÖDT. Als Meßelektrode (Anode) dient eine platiniierte Platinelektrode, die gegen eine Hg/Hg_2SO_4 -Elektrode geschaltet wird, die in gesättigter Na_2SO_4 -Lösung gehalten wird und durch ein Diaphragma von der Meßlösung, dem Elektrolyten, getrennt ist. Das H_2O_2 wird bei der Messung anodisch oxydiert und es fließt ein seiner Konzentration proportionaler Diffusionsstrom, wenn man Rührvorgang, Temperatur und Elektrodenoberfläche konstant hält und wenn das Potential der Anode auf $E = 1,17 - 0,06 p_H$ (Volt) bei 25°C gegen die Normalwasserstoffelektrode gehalten wird.

Für die Versuche wurde ein Elektrodengefäß von 200 ml Inhalt verwendet (Abb. 1). Es wurden gleichzeitig H_2O_2 und O_2 gemessen. Um zu sehen, ob sich beide Stromkreise irgendwie beeinflussen, wurde abwechselnd der eine und der andere Stromkreis unterbrochen, was keinen Einfluß hatte. Außerdem wurden die Konzentrationen an O_2 und H_2O_2 geändert und es zeigte sich, daß bei den in den Versuchen angewendeten Konzentrationen keine gegenseitige Beeinflussung stattfindet. Das Anodenpotential wurde durch einen Potentiostaten⁶ eingestellt und konstant gehalten.

Alle Mengenangaben der reduzierenden Stoffe sind Vergleichswerte bezogen auf H_2O_2 . Erhält man durch die reduzierenden Stoffe einen bestimmten Stromzuwachs, so wird dieser, um ihn vergleichen zu können, in Mol/l H_2O_2 ausgedrückt, die denselben Stromzuwachs erzeugen würden. Geeicht wird die Apparatur für H_2O_2 und O_2 , indem man vor und nach jedem Versuch eine bekannte O_2 - oder H_2O_2 -Menge durch eine Zugabevorrichtung direkt in den Elektrolyten gibt und den Stromzuwachs registriert.

Die Züchtung des Versuchsmaterials geschah wie schon früher beschrieben⁷. Die geerntete Chlorella wurde in der Zuchtlösung im Eisschrank aufbewahrt und bei Bedarf abgeschleudert und einmal mit Phosphatpuffer $p_H 5,4$ gewaschen. Für die Messungen wurde eine Zellkonzentration von 40 mm³ Zellen pro cm³ Phosphatpuffer $p_H 5,4$ verwendet. Als Lichtquelle dienten drei 200-W- und eine 300-W-Osram-Metallfadenlampe, welche in einer Entfernung von 10 cm vom Reaktionsgefäß angebracht waren. Eine 200-W-Lampe hat in dieser Entfernung eine Beleuchtungsstärke von ~ 17 000 Lux.

Mit allen Stoffen, die dem Elektrolyten zugesetzt wurden, wie Gifte und Zuckerlösungen wurden Blindversuche unternommen. Es wurden nur solche Stoffe

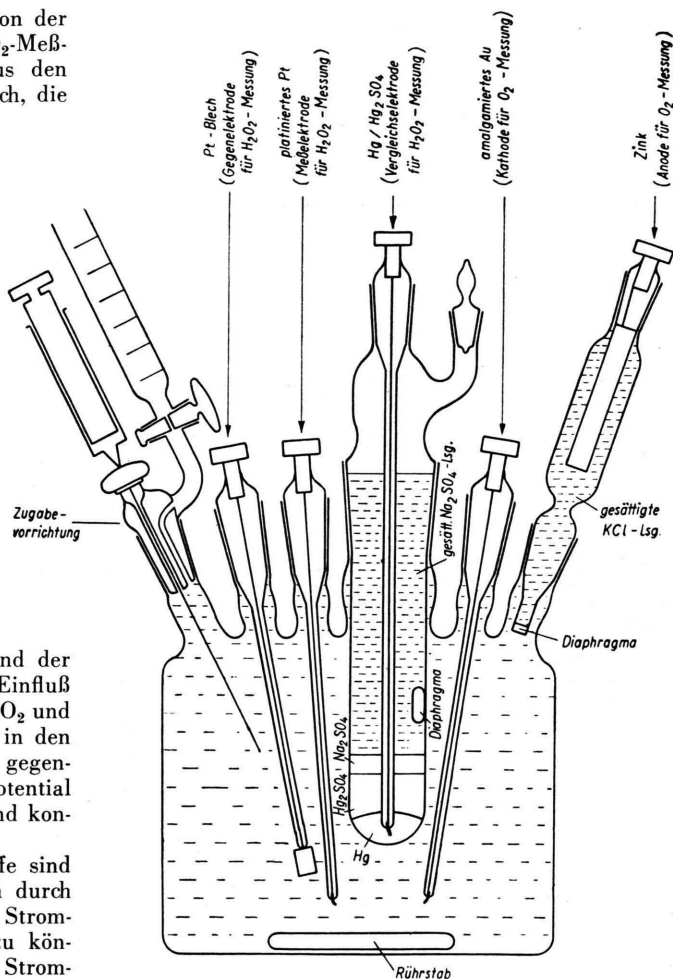


Abb. 1. Elektrodengefäß mit Elektroden für O_2 - und H_2O_2 -Messung und Zugabe-Einrichtung.

verwendet, die keinen Einfluß auf die Messung des O_2 und H_2O_2 hatten. Aus diesen Gründen konnten z. B. Vergiftungsversuche mit KCN oder NaN_3 nicht durchgeführt werden. Versuche mit toten Zellen, die belichtet wurden, ergaben keine Konzentrations-Änderungen des O_2 oder H_2O_2 .

Versuche

Abb. 2. zeigt einen Versuch mit 5% CO_2 in N_2 nach 15-stdg. Inkubation. Wie man sieht, steigen die reduzierenden Stoffe nach Einschalten des Lichtes um $100 \cdot 10^{-6}$ Einheiten steil an und fallen unter

⁵ K. DAMASCHKE u. D. WINKELMANN, Z. Naturforsch. 11 b, 85 [1956].

⁶ W. SCHWARZ, Chemie-Ing.-Techn. 6, 423 [1956].

⁷ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Z. Naturforsch. 10 b, 215 [1955].

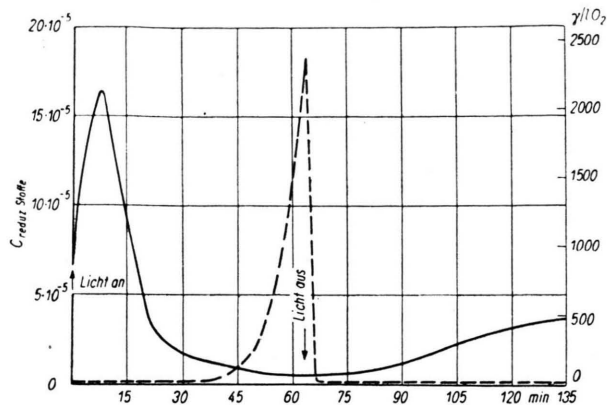


Abb. 2. 5% CO_2 in N_2 , 15 Stdn. inkubiert. Bildung der reduz. Stoffe (—) im Hellen und im Dunkeln im Vergleich zur O_2 -Produktion (-----).

weiterer Lichteinwirkung plötzlich ab. Geht die schnelle Zersetzung des reduzierenden Stoffes im Licht in eine langsamere über, so wird O_2 frei. Wird nach Erreichen der vollen Photosynthese das Licht ausgeschaltet, so beginnt sich in dem Augenblick, in dem die Atmung aufhört, d. h. die O_2 -Konzentration Null ist, wieder ein reduzierender Stoff im Dunkeln zu bilden. Aus den verschiedenen Bildungs- wie Zersetzungs-Geschwindigkeiten ist zu schließen, daß es sich um zwei verschiedene Stoffe handelt, von denen der eine im Hellen, der andere im Dunkeln gebildet wird. Abb. 3 zeigt ebenfalls deutlich die Bestätigung dieser Annahme.

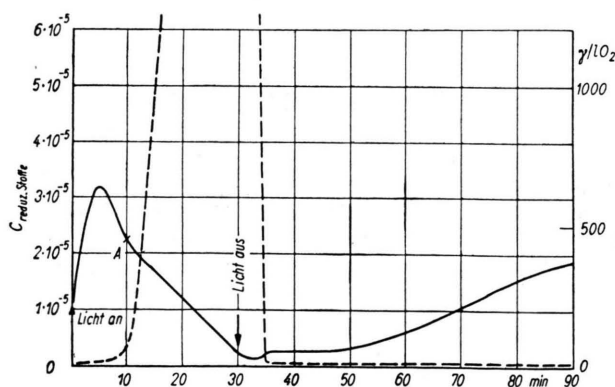


Abb. 3. 10% CO_2 in N_2 , $\frac{1}{2}$ Stde. inkubiert. — reduz. Stoffe, ----- Sauerstoff.

Bei diesem Versuch wurde eine Chlorellasuspension mit 10% CO_2 in N_2 verwendet und eine halbe Stde. inkubiert. Man sieht, wie sich beim Lichteinschalten schnell ein reduzierender Stoff bildet und dieser im Licht wieder zersetzt wird. Bei Punkt A wird die

Zersetzungs-Geschwindigkeit plötzlich langsamer, zur selben Zeit setzt die Sauerstoffproduktion ein. Bei der später folgenden Dunkelperiode steigt der eine reduz. Stoff wieder bis auf das Niveau des Punktes A an. Bei Abwesenheit von CO_2 werden die reduz. Stoffe ebenfalls gebildet, ein Einsetzen der Photosynthese konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Um zu sehen, ob es sich um flüchtige oder nicht-flüchtige reduzierende Stoffe handelt, wurde während der Inkubationszeit reiner N_2 durchgeleitet. Es zeigte sich, daß nach $1\frac{1}{2}$ Stdn. Inkubation unter N_2 -Durchleiten beim Einschalten des Lichts zuerst wieder schlagartig ein reduz. Stoff in der Größenordnung von $1,4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l H_2O_2 entsteht, von dem etwa $\frac{1}{4}$ im Licht wieder verbraucht wird. Die restliche Menge bleibt vom Licht unbeeinflusst. Schaltet man nun den N_2 -Strom ab, so steigen die reduz. Stoffe auf $4,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l H_2O_2 an und werden unter weiterer Lichteinwirkung wieder verbraucht. Leitet man während des Verbrauchs der reduz. Stoffe erneut N_2 ein, so fällt die Menge der reduz. Stoffe auf etwa die am Anfang durch Licht erzeugte Höhe ab. Derselbe Versuch wurde mit 17 Stdn. Inkubation unter N_2 -Durchleiten wiederholt. Hierbei zeigte sich, daß die durch Licht erzeugte Menge der reduz. Stoffe dieselbe wie im Vorversuch war, dagegen steigen die reduz. Stoffe, die nach Ausschalten des N_2 -Stromes gebildet werden auf etwa den doppelten Wert; sie sind also von der Inkubationszeit abhängig.

Es wurde nun die Hemmbarkeit der Bildung der reduz. Stoffe durch *o*-Phenantrolin untersucht. Dabei

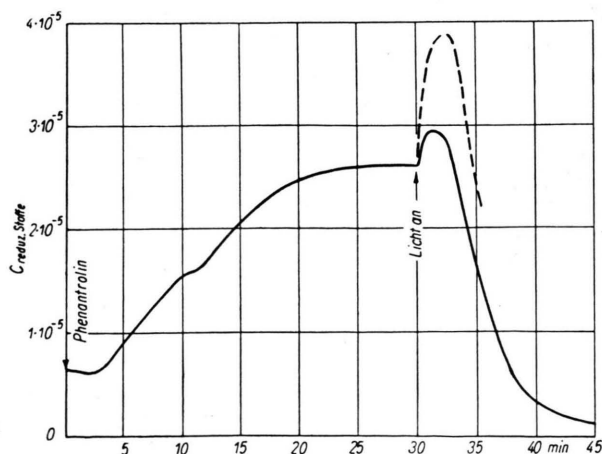


Abb. 4. Ohne CO_2 , 20 Stdn. inkubiert. Einfluß von 3 ml ges. *o*-Phenantroline auf die Bildung der reduz. Stoffe im Hellen und im Dunkeln. — mit *o*-Phenantroline, ----- Parallelversuch ohne Phenantroline.

zeigte sich, daß der Vorgang der Bildung des reduz. Stoffes im Licht durch *o*-Phenantrolin hemmbar ist, während das im Dunkeln nicht der Fall ist (Abb. 4 und 5).

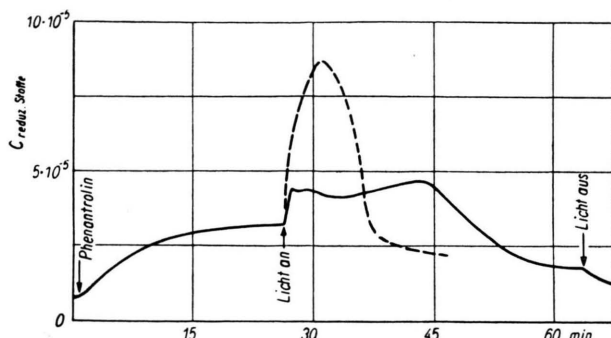


Abb. 5. 50% CO₂ in N₂, ³/₄ Std. inkubiert. Einfluß von 2 ml ges. *o*-Phenantrolin auf die Bildung der reduz. Stoffe im Hel- len und im Dunkeln. — mit Phenantrolin, - - - - ohne Phenantrolin.

Weiterhin wurden Versuche mit *p*-Chlormercuribenzoessäure ($2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) ^{9,10} angestellt, welche dafür bekannt ist, daß sie die anfängliche O₂-Entwicklung hemmt. Wir konnten feststellen, daß auch die Produktion der reduzierenden Stoffe gehemmt wird. Es werden nur soviel reduzierende Stoffe gebildet, wie unter gleichen Bedingungen, ohne das Gift, unter Durchleiten von N₂ während der Licht- einstrahlung entstehen würden.

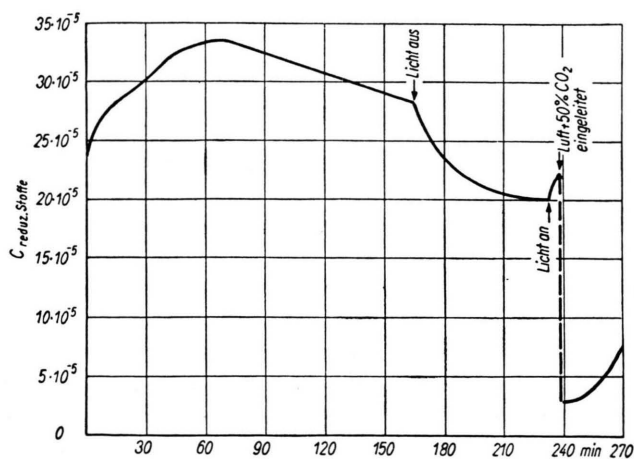


Abb. 6. 50% CO₂ in N₂, 17 Std. inkubiert. Zerstörung des im Licht gebildeten reduz. Stoffes durch Einleiten von Luft.

Wie wir schon früher zeigten ⁸, hängt der Beginn der Photosynthese von der Länge der vorhergegan- genen anaeroben Inkubationszeit ab. Jetzt konnten wir feststellen, daß auch die Menge der im Licht ge- bildeten reduz. Stoffe mit der Länge der Inkuba- tionszeit zunimmt (Tab. 1).

Inkub.-Zeit [h]	Zeit b. z. Beginn d. Photosynthese [Min.]	Konzentration d. reduz. Stoffe [$\cdot 10^{-6}$ Mol/l]
¹ / ₂	5	0,5
¹ / ₂	6	2,2
17	14	9,8

Tab. 1. Abhängigkeit der Menge der reduz. Stoffe von der Inkub.-Zeit in Anwesenheit von 2,5% CO₂ in N₂.

Leitet man während der Bildung der reduz. Stoffe im Licht vor Beginn der Photosynthese Luft in die Chlorellasuspension, so wird schlagartig der reduz. Stoff zerstört, um sofort, nachdem die O₂-Konzentra- tion wieder Null geworden ist, sich erneut zu bilden (Abb. 6).

Um den Einfluß von O₂ auf die Zersetzung der im Licht gebildeten reduz. Stoffe zu studieren, wurde während der Zersetzung derselben, jeweils $1 \cdot 10^{-5}$ Mcl/l H₂O₂ in die Chlorellasuspension gegeben (Abb. 7). Es wurde, um den Vorgang langsamer ab- laufen zu lassen, statt mit einer Beleuchtungsstärke von 76 500 Lux, zu Beginn des Versuchs nur mit einer von 17 000 Lux belichtet. Das H₂O₂ wird durch die in der Chlorella vorhandene Katalase so-

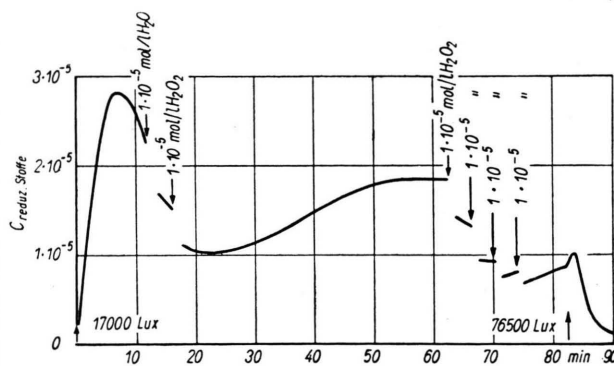


Abb. 7. 50% CO₂ in N₂, ³/₄ Std. inkubiert. Einfluß von Sauerstoff (gebildet durch H₂O₂) auf die im Licht gebildeten reduz. Stoffe.

⁸ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Z. Naturforschg. **10b**, 572 [1955].

⁹ C. P. WITTINGHAM, J. exp. Bot. **7**, 273 [1956].

¹⁰ D. I. ARNON, B. ALLEN u. F. R. WHATLEY, Nature [London] **174**, 394 [1954].

fort zersetzt und der frei gewordene O_2 reagiert mit den reduz. Stoffen. Diese werden vermutlich oxydiert. Um abschätzen zu können, wieviel O_2 bei der Zugabe von H_2O_2 zur Chlorellasuspension frei wird, und wieviel für die Oxydation verbraucht wird, wurden nachfolgende Versuche unternommen.

Wie bereits erwähnt, ist einmal der Beginn der Photosynthese und zum anderen die Menge der gebildeten reduz. Stoffe von der Inkubationszeit abhängig. Es wurde deshalb H_2O_2 zu verschiedenen lang inkubierten Chlorellasuspensionen gegeben.

I. 5% CO_2 , nicht inkubiert

Nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l H_2O_2 hätten theoretisch nach völliger Zersetzung desselben 8000 γO_2 pro l auftreten müssen. Diese Mengen wurden jedoch nicht erreicht. Sie wurden aber erreicht, wenn man das H_2O_2 in Phosphatpuffer mit Katalase zersetzte. Jede erneute H_2O_2 -Zugabe erfolgte in dem Moment, in dem die O_2 -Konzentration gerade wieder Null geworden war.

	O_2 -Menge [γ/l]
Bei der ersten Zugabe der angegebenen H_2O_2 -Menge entstanden:	3650
bei der zweiten:	3650
bei der dritten:	3650
bei der vierten:	4000

also ungefähr die Hälfte der zu erwartenden O_2 -Menge.

II. 5% CO_2 , 1 Stde. inkubiert

Zugabe	O_2 -Menge [γ/l]	Zugabe	O_2 -Menge [γ/l]
1.	2800	3.	4100
2.	3700	4.	4100

Um noch einmal die Menge festzustellen, die maximal erscheinen kann, wurde die Chlorella bis zur vollen Photosynthese belichtet und dann H_2O_2 zugegeben. Es wurden ebenfalls 4100 $\gamma O_2/l$ gefunden.

III. 5% CO_2 , 16 Stdn. inkubiert (Abb. 8)

Zugabe	O_2 -Menge [γ/l]	Zugabe	O_2 -Menge [γ/l]
1.	1700	6.	3850
2.	2300	7.	4200
3.	2500	8.	4300
4.	2800	9.	4300
5.	3400		

Nach Erreichen der vollen Photosynthese erschienen bei der H_2O_2 -Zugabe ebenfalls 4300 $\gamma O_2/l$.

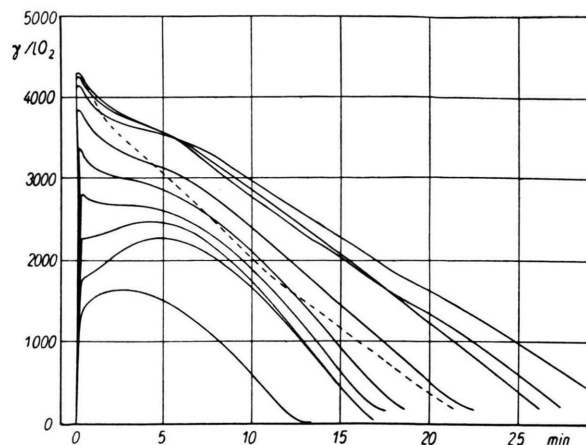


Abb. 8. 50% CO_2 in N_2 , 16 Stdn. inkubiert. Ansteigen der O_2 -Konzentration bis zum maximal erreichbaren Wert von 4300 $\gamma O_2/l$ durch immer erneute H_2O_2 -Zugabe in dem Moment, in welchem die O_2 -Konzentration gerade wieder Null geworden ist.

Wir hatten gezeigt, daß mit der Verlängerung der Inkubationszeit die Menge der Stoffe zunimmt, die den Beginn der Photosynthese verzögern. Diese Versuchsreihen zeigen, daß je mehr von diesen Hemmstoffen vorhanden sind, desto mehr O_2 verbraucht wird, und dieser deshalb nicht zur Anzeige gelangt. Sind alle Hemmstoffe oxydiert, so beginnt die Photosynthese. Dies wurde dadurch bewiesen, daß zu dem Zeitpunkt belichtet wurde, an dem durch eine erneute H_2O_2 -Zugabe die frei gewordenen O_2 -Mengen (z. B. b. III 8) nicht mehr größer wurden.

Einfluß der Beleuchtungsstärke auf die Bildung der reduz. Stoffe

Um den Einfluß der Beleuchtungsstärke auf die Bildung der reduz. Stoffe zu studieren, wurde von einer 30 Min. lang inkubierten Chlorellasuspension mit 2,5% CO_2 in N_2 ausgegangen. Bei der Belichtung mit verschiedenen Beleuchtungsstärken wurde festgestellt, daß die Menge der gebildeten reduz. Stoffe von der Beleuchtungsstärke unabhängig ist, jedoch die Bildungsgeschwindigkeit von derselben abhängt (Abb. 9). Bis zu einer Beleuchtungsstärke von 34 000 Lux ist die Bildungsgeschwindigkeit der reduz. Stoffe der Beleuchtungsstärke, unter unseren Versuchsbedingungen proportional, wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist.

Durch Veränderung der Zellkonzentration von $c = 1$ bis $c = 40$ wurde der Einfluß derselben auf die Menge der sich bildenden reduz. Stoffe sowie auf

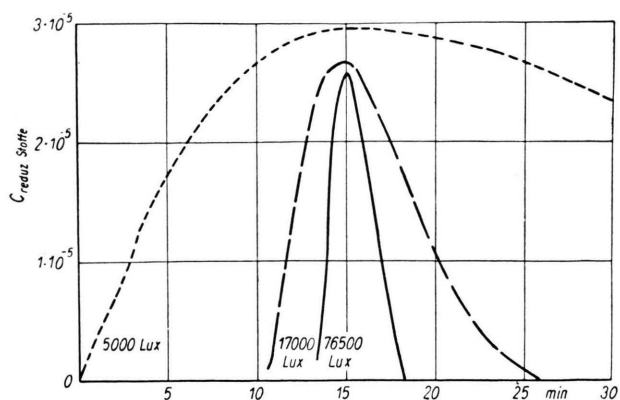


Abb. 9. 2,5% CO₂ in N₂, 1/2 Stde. inkubiert. Einfluß der Beleuchtungsstärke auf die Bildung des reduz. Stoffes.

Beleuchtungsstärke [Lux]	Bildungsgeschwindigkeit [min] ⁻¹
10 000	0.125
20 000	0.25
30 000	0.37
40 000	0.46
50 000	0.52
60 000	0.565
70 000	0.585
75 000	0.59

Tab. 2. Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit der reduz. Stoffe von der Beleuchtungsstärke.

deren Bildungs-Geschwindigkeit untersucht. Die Versuche ergaben, daß in den oben angegebenen Grenzen sowohl die Menge als auch die Bildungs-Geschwindigkeit der reduz. Stoffe von der Zellkonzentration unabhängig waren. Erst unterhalb $c=1$ nahm die Menge der reduz. Stoffe ab.

Über die Art der entstandenen reduz. Stoffe lassen sich keine genauen Angaben machen. Es wurden verschiedene Gruppen von Stoffen untersucht, um

einen Hinweis zu erhalten, um was für Stoffe es sich handeln könnte. Ihre Nachweis-Möglichkeit durch die elektrochemische H₂O₂-Meßmethode ist in Tab. 3 dargestellt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die gleiche Molarität H₂O₂.

Angezeigt wurden	H ₂ O ₂ : Subst.	Subst. : H ₂ O ₂
Ameisensäure	1 : 0,09	1 : 11
Chinhydron	1 : 1	1 : 1
Hydrochinon	1 : 0,85	1 : 1,2
Formaldehyd	1 : 0,55	1 : 1,9
Mannose	1 : 0,008	1 : 120
Maltose	1 : 0,005	1 : 200
Brenzkatechin	1 : 1,8	1 : 0,55
Resorcin	1 : 0,007	1 : 150
Natriumazid	1 : 1,4	1 : 0,72
p-Aminophenolhydrochlorid	1 : 1,9	1 : 0,53
Glucosaminhydrochlorid	1 : 0,03	1 : 33
Hydroxylamin	1 : 1	1 : 1
Benzoylperoxyd		
α-Naphtol		
Von den Gasen: Wasserstoff und Kohlenmonoxyd		

Tab. 3. Anzeige verschiedener Substanzen durch die elektrochemische H₂O₂-Meßmethode.

Nicht angezeigt wurden:

Acetaldehyd	Erythrit	Leucin
Para-Formaldehyd	Arabinose	Adenosin
Benzaldehyd	Sorbose	Cholestrin
Nitrobenzaldehyd	Glucose	Tyrosin
Oxalsäure	Laevulose	Glykogen
Milchsäure	Xylose	Aethylenglykol
Brenztraubensäure	Lactose	
Glucuron	Galaktose	
Glucuronsäurelacton	Raffinose	
Gluconsäurelacton		

Frl. M. LÜBKE möchte ich an dieser Stelle für ihre verständnisvolle und gewissenhafte Mitarbeit danken.