

Quantitative UV-Spektren der Cnicussubstanz C und des Arctiins

Die UV-Absorptionskurven (Bereich von 210 bis 290 m μ) der Cnicussubstanz C und des Arctiins aus *Arctium lappa* L. stimmten nach Lage und Höhe der Banden überein. Die korrespondierenden Aglyka der

beiden Substanzen zeigten die gleichen Maxima. Cnicussubstanz C, Maxima: $\lambda = 211 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,20$), $\lambda = 230 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,18$), $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,71$). Arctiin, Maxima: $\lambda = 211 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,24$), $\lambda = 230 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,20$), $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,74$).

Photosyntheseversuche in Tritiumwasser mit *Chlorella*

Von HELMUT SIMON, HANS-DIETER DORRER und ACHIM TREBST

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforschg. **19 b**, 734—744 [1964]; eingegangen am 31. März 1964)

The incorporation of tritium into carbohydrates during photosynthesis with *Chlorella* was investigated. The fixation of ^{14}C and T was compared by providing $^{14}\text{CO}_2$ and HOT simultaneously. The intramolecular distribution of T in hexose and glyceric acid was determined by degradation. The incorporation of T during the carboxydismutase, the aldolase and triosephosphate-isomerase reaction was studied in enzyme systems.

The results indicate that — in general — incorporation of T into the products of photosynthesis is due to isomerisation reactions. The influence of isotope effects at various stages of the photosynthetic cycle on the final T-content is discussed.

The intramolecular T-distribution in the glucose from starch is different from that of soluble glucose derivatives. To interpret this, it is assumed that the isomerisation of fructose-6-phosphate to glucose-6-phosphate firstly is completely intramolecular in intact *Chlorella* and secondly shows a large discrimination for tritium-containing (at C-1) molecules. Thirdly, it is proposed that the sequence of reactions from fructose-6-phosphate to starch occurs in a multienzyme system without exchange with free sugar phosphate-pools.

Die Photosynthese besteht in der Bildung von Kohlenhydraten und Sauerstoff aus Kohlendioxid und Wasser. Die Versuche von CALVIN mit ^{14}C klärten den Weg des Kohlenstoffs auf¹.

Untersuchungen mit einem Isotop des anderen Substrates (D oder T) trugen bisher wenig zum Verständnis der Kohlenhydrat-Biosynthese bei. Der Einbau von T während der Photosynthese in verschiedene Substanzgruppen, wie Chlorophylle, Carotine oder Plastochinon, wurde von VISHNIAC² studiert.

MOSES und CALVIN³ zeigten, daß Tritium aus HOT* nach kurzen Fixierungszeiten in *Chlorella* in den gleichen Substanzen auftritt wie ^{14}C nach Gabe von $^{14}\text{CO}_2$. Besonders Glykolsäure und andere organische Säuren hatten jedoch eine überraschend hohe T-Aktivität. Der Einbau von T in Zuckerderi-

vate betrug im Dunkeln immer noch die Hälfte von dem im Licht.

ARONOFF und CHOI⁴ ließen ein Sojabohnen-Blatt in einer HOT-haltigen Atmosphäre photosynthetisieren und verglichen die spez. Aktivität der gebildeten Zucker mit der des Wassers. Vor einigen Jahren boten wir⁵ *Chlorella* und Chloroplasten aus Spinat gleichzeitig $^{14}\text{CO}_2$ und HOT an und bestimmten den T-Einbau pro ^{14}C in einigen Kohlenhydraten. GOLDSBY und BASSHAM⁶ berichteten kürzlich über ähnliche Versuche des Einbaus von ^{14}C und T in einige organische Säuren.

Über die Ergebnisse weiterer Versuche zur photosynthetischen Fixierung von T in *Chlorella*, insbesondere über die intramokeluläre Verteilung von T in Hexosen aus Hexosephosphaten, Stärke und Saccharose, soll hier berichtet werden. Zum Vergleich

¹ J. A. BASSHAM u. M. CALVIN, The Path of Carbon in Photo-Photosynthesis, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.Y. 1957.

² W. VISHNIAC, Symposiumsvortrag V. Int. Kongreß f. Biochemie, Moskau 1961, Pergamon Press 1963.

³ V. MOSES u. M. CALVIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **33**, 297 [1959].

* Folgende Abkürzungen wurden benutzt: HOT = tritiumhaltiges Wasser; FdiP = Fructose-1,6-diphosphat; RudiP

= Ribulose-1,5-diphosphat; PGS = 3-Phosphoglycerinsäure; GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat; DHAP = Dihydroxyacetonphosphat; F-6-P = Fructose-6-phosphat; G-6-P = Glucose-6-phosphat; AeDTE = Äthylendiamintetraessigsäure; Tris = Trihydroxymethyl-aminomethan.

⁴ S. ARONOFF u. I. C. S. CHOI, Arch. biochem. Biophysics **102**, 159 [1963].

⁵ H. SIMON u. A. TREBST, Z. Naturforschg. **16 b**, 285 [1961].

⁶ R. A. GOLDSBY u. J. A. BASSHAM, UCRL-9652, 139 [1962].

wurde der Tritiumeinbau während der Photosynthese mit der T-Fixierung bei einigen isolierten Enzym-Reaktionen untersucht und ebenfalls die intramolekulare T-Verteilung in den Produkten bestimmt.

Die Besonderheiten des Arbeitens mit Wasserstoffisotopen, hervorgerufen durch das Vorliegen von Austauschreaktionen, großen Isotopeneffekten, Fixierungen von Wasserstoff in stabile Bindungen durch Isomerisierungs-Reaktionen etc., erschweren meist die Interpretation der Versuchsergebnisse. Andererseits können sie mitunter zu Aussagen führen, die auf andere Weise nicht oder nur schwer gewonnen werden können. Hierfür ist ein Ergebnis dieser Arbeit ein Beispiel.

Ergebnisse

a) Photosynthetischer Einbau von Tritium pro ^{14}C

Die Belichtung von *Chlorella* bei gleichzeitiger Anwesenheit von T-markiertem Wasser und $^{14}\text{CO}_2$ führte in voneinander unabhängigen Versuchen zu den in den Tab. 1 und 2 angegebenen Ergebnissen.

Sie geben den Tritiumeinbau pro ^{14}C in verschiedenen Zwischen- und Endprodukten wieder und sind auf das Vorliegen von T_2O -Molekeln im Medium bezogen (s. nähere Erläuterung bei Beschreibung der Versuche).

Es zeigt sich, daß man verschiedene Versuche in quantitativer Hinsicht nicht miteinander vergleichen kann, denn für eine gleiche Substanz können bei gleicher Belichtungszeit die Resultate um nahezu 50% variieren (z. B. bei Gesamt-Fructose 2 Min., Versuch Nr. 2 und 3, Tab. 1).

Der Gesamt-Tritiumeinbau pro ^{14}C fällt innerhalb eines Versuches mit der Belichtungszeit. Bei „ CO_2 -verarmten“ *Chlorella* ist der Tritiumeinbau höher

	Verhältnis von T/ ^{14}C	
	ohne Vorinkubation (10 Min.) der Algen in HOT	mit
Gesamteinbau (lösl. + unlösl.)	2,93	4,22
Gesamteinbau (lösl.)	1,94	3,52
Diphosphate	0,75	1,10
Monophosphate	0,75	0,87
Phosphoglycerinsäure	0,72	0,98
Glycerinsäure	0,53	0,75
Glucose aus Monophosphaten	0,76	0,92
Fructose aus Monophosphaten	0,83	0,97
Sedoheptulose aus Monophosph.	0,72	0,87
Fructose aus Diphosphaten	0,75	0,93
Ribulose aus Diphosphaten	1,19	1,35
Glucose aus Saccharose	1,03	1,93
Fructose aus Saccharose	1,14	1,70
Glucose aus Stärke	0,64	1,08

Tab. 2. Tritiumeinbau pro ^{14}C in verschiedene Substanzen nach 2 Min. Photosynthese mit *Chlorella pyrenoidosa* in HOT und mit $^{14}\text{CO}_2$.

(s. Tab. 2). In den wasserunlöslichen Fraktionen wird mehr T pro ^{14}C fixiert als in den wasserlöslichen. Ein Vergleich des T/ ^{14}C -Verhältnisses einzelner isolierter Substanzen zeigt den höchsten T-Einbau in Glykolsäure, den geringsten in Glycerinsäure. Hexosen aus löslichen Monophosphaten haben ein vergleichbares T/ ^{14}C -Verhältnis, dagegen enthalten diejenigen aus Saccharose deutlich mehr. Von den Kohlenhydraten hat die Glucose aus Stärke beim nicht-vorinkubierten Versuch den geringsten T-Gehalt pro ^{14}C . Eine Vorinkubation der Algen mit HOT bewirkt in den verschiedenen Substanzen einen um 20 – 90% höheren T-Einbau.

b) Die intramolekulare T-Verteilung in Hexosen

Tab. 3 gibt die intramolekularen Tritiumverteilungen in verschiedenen Hexosen nach Photosynthesezeiten von 1 – 40 Min. wieder. Die Radioaktivi-

Versuch	1		2			3		
Belichtungszeit [Min.]	3++	6++	1	2	1+	0,5	2	5
	Verhältnis Tritium Kohlenstoff-14							
Gesamt-Einbau (lösl. + unlösl.)	6,3	4,1	2,7	—	7,6	4,6	2,8	2,2
Glucose	1,4	1,3	—	—	—	1,8	3,3	1,3
Fructose	1,7	1,4	1,7	2,3	—	1,5	1,4	—
Glycerinsäure	—	—	0,7	0,7	—	1,1	0,9	1,3
Glykolsäure	6,2	4,3	—	—	—	6,7	—	—

Tab. 1. Tritiumeinbau pro ^{14}C in verschiedene Substanzen bei Photosynthese-Versuchen mit *Chlorella pyrenoidosa* in HOT und mit $^{14}\text{CO}_2$. + = „ CO_2 -verarmte“ *Chlorella*. ++ = Algen 20 Min. im Dunkeln mit HOT vorinkubiert.

tät der wiederholt chromatographierten Hexosen in Lösung wurde gleich 100% gesetzt.

Die T-Verteilungen sind in den verschiedenen Positionen der Hexoseketten innerhalb der untersuchten Zeiten nicht sehr stark unterschiedlich. Lediglich bei einigen C-Atomen ist eine gewisse Abhängigkeit des prozentualen Tritiumgehalts mit der Zeit zu beobachten. So nimmt die anfänglich hohe Tritiumaktivität am C-1 der Fructose mit der Zeit sehr rasch ab. Es zeigt sich deutlich, daß dies besonders auf Kosten eines der beiden (enzymatisch nicht gleichwertigen) H-Atome geht (s. hierzu li. c.⁷ und Beschreibung der Versuche). Der T-Gehalt am C-1 der Fructose ist immer höher als die Summe der T-Aktivitäten von C-1 und C-2 aus der entsprechenden Glucose (s. z. B. Glucose und Fructose nach 1, 2, 5 und 40 Min. Photosynthese, Tab. 3). Dies tritt wiederum bei kurzen Belichtungszeiten besonders deutlich hervor.

Einen Sonderfall stellen die aus Stärke gewonnenen Glucosen dar. Sie weisen am C-2 bei Versuchen bis zu 20 Min. Belichtungszeit praktisch kein Tritium auf; auch nach 40 Min. Photosynthese ist die Aktivität an C-2 mit 8,5% der Gesamtaktivität am geringsten. Unter den Glucosen, die aus anderen Fraktionen stammen, weisen die der Monophosphate an C-1 den höchsten T-Gehalt auf. Der T-Gehalt an C-3 ist meist geringer als an C-4 und C-5; auch bei den Hexosen, bei denen keine getrennte Bestimmung von C-4 und C-5 gemacht wurde, ist C-3 immer geringer als die halbe Summe von C-4 und C-5. Der T-Gehalt an den C-Atomen 6 ist, besonders bei kurzen Belichtungszeiten, relativ gering. Er entspricht im allgemeinen dem Einbau in C-5.

Innerhalb eines gleichen Versuchs weisen Glucose bzw. Fructose aus verschiedenen Fraktionen keine großen Unterschiede auf. Fructosen aus Saccharose haben jedoch an C-6 einen etwas höheren T-Gehalt als die Glucosen aus der gleichen Saccharose (s. Glucose und Fructose nach 5 und 40 Min. Photosynthese), bei den Monophosphaten ist das Gegenteil der Fall (s. Glucose und Fructose nach 5 Min. Photosynthese).

c) Tritiumeinbau bei enzymatischen Reaktionen *in vitro*

Der Austausch von Wasserstoff an FdIP durch Aldolase und einen Überschuß von Triosephosphat-

isomerase in HOT führt zu der in Tab. 4 angegebenen Verteilung von Tritium in der Fructose. C-3 und C-5 zeigen praktisch die gleiche T-Aktivität und auch diejenige an C-4 ist nicht wesentlich geringer. Einwirkung von Triosephosphat-isomerase auf ein Triosephosphatgemisch in HOT und anschließende Zugabe von Aldolase bewirkt jedoch bei vergleichsweise geringer Inkubationszeit mit Aldolase nur geringfügigen Einbau in C-4.

Bei Inkubation von RudiP in HOT in Gegenwart von Carboxydismutase und Abwesenheit von CO₂ wurde der in Tab. 5 zusammengestellte T-Gehalt und die entsprechende Tritiumverteilung in der Pentose erhalten. Bei Anwesenheit von ¹⁴CO₂ erfolgte die vollständige Umsetzung zu zwei Molekülen PGS. Tab. 6 gibt den Tritiumeinbau pro ¹⁴C und das Abbauergebnis solcher PGS wieder. Zum Vergleich sind die Verhältnisse T/¹⁴C und die intramolekulare T-Verteilung in photosynthetisch gewonnenen Glycerinsäuren aufgeführt.

Diskussion

Im Calvin-Schema der photosynthetischen Kohlenhydratbildung¹ gibt es mehrere Stellen des Tritiumeinbaus. Neben der Reduktion der PGS führt die Hydrolyse des Anlagerungsproduktes von CO₂ an RudiP und die Isomerisierungs-Reaktionen an Triose-, Pentose- und Hexosephosphaten zu stabilen C-T-Bindungen. Ausgehend von RudiP würde man aus diesem Schema nach einmaligem Durchlaufen des Cyclus in der PGS ein T/¹⁴C-Verhältnis von 1 und Lokalisation des Tritiums in C-2 und in FdiP folgende Verteilung ablesen:

	Tritiumgehalt in % im F-di-P	
	nach einem Cyclus	nach Gleich- verteilung
C-1	0	0
C-2	0	0
C-3	40 — 33	14,3
C-4	40 — 33	14,3
C-5	20 — 33	14,3
C-6	0	0
T/ ¹⁴ C- Verhältnis	2,5	7/6

Die 1. Reihe (nach einem Cyclus) gilt für den Fall, daß die Isomerisierung von GAP zu DHAP nur in dieser Richtung erfolgt. Vollständige Gleichgewichtseinstellung (möglich durch geringere Aldo-

⁷ H. SIMON, H. D. DORRER U. A. TREBST, Chem. Ber. **96**, 1285 [1963].

Belichtungs- zeit [Min.]		1	1	2,5	2,5	5	5	5
	aus:	Fructose M + S	Glucose M + S	Fructose M + S	Glucose M + S	Fructose M	Glucose M	Fructose S
C-Atom	Tritiumgehalt in Prozent							
C-1		60,0 (46,6) *	9,3	47,8 (34,1) *	6,5	48,1 (29,7) *	10,3	39,8 (22,7) *
C-2		—	18,6	—	27,9	—	38,7	—
C-3		7,0	14,2	5,1	10,4	13,2	13,6	7,5
C-4		—	—	—	17,6	—	—	13,4
C-5		—	—	—	13,8	—	—	14,7
C-4+5		22,2	33,3	31,6	31,4	22,7	26,4	28,1
C-6		9,9	16,2	12,3	15,3	15,3	20,0	19,7
Summe		99,1	91,6	96,8	91,5	99,3	99,0	95,1

Belichtungs- zeit [Min.]		5	5		5	5	10		10	10
	aus:	Glucose S	Fructose Ges.		Glucose Ges.	Glucose St.	Fructose Ges.		Glucose Ges.	Glucose St.
C-Atom	Tritiumgehalt in Prozent									
C-1		11,6	34,6 (10,5) *		15,6	12,9	20		12	14,9
C-2		23,1	—		15,3	< 1	—		30,8	< 1
C-3		12,0	7,3		8,9	16,4	—	10,5**		8,2
C-4		12,4		24,4**		—		22,9		19,1
C-5		15,2		16,0		—		11,4		30,0
C-4+5		27,6		39,0		40,5		34,3		49,1
C-6		15,4		19,2		25,0		18,3		24,9
Summe		89,7	100,1		97,0	94,8	83,4		106,2	97,1

Belichtungs- zeit [Min.]		20		20	20	40	40	40
	aus:	Fructose Ges.		Glucose Ges.	Glucose St.	Fructose S	Glucose S	Glucose St.
C-Atom	Tritiumgehalt in Prozent							
C-1		34		15	14,3	34,3 (16,8) *	9,3	10,8
C-2		—		9,7	< 1	—	15,7	8,5
C-3			8,4**		15,3	14,8	15,2	13,8
C-4			20,0		19,5	26,8	14,6	17,7
C-5			8,0		22,1	3,2 ?	20,3	18,9
C-4 + 5			28,0		41,6	30,0	34,9	36,6
C-6			15,4		25,6	24,5	19,7	21,3
Summe		113,8		104,5	96,8	103,6	94,8	91,0

Tab. 3. Intramolekulare Tritiumverteilung in Hexosen verschiedener Herkunft. M = Monophosphate, S = Saccharose, St. = Stärke, Ges. = Glucose bzw. Fructose aus Diphosphaten, Monophosphaten und Saccharose. * Die bei den Fructosen unter C-1 in Klammern angegebenen Werte stellen den Radioaktivitätsanteil dar, der bei der Osazonbildung verloren geht. ** Glucose- und Fructose-triazol wurden gemeinsam abgebaut.

lase-Aktivitäten) der Triosephosphate würde nach einem Cyclus eine Gleichverteilung des Tritiums über C-3, C-4 und C-5 ergeben (2. Reihe).

Eine solche Verteilung ist allerdings nicht zu erwarten, da folgende Punkte unberücksichtigt blieben:

1. Beim Arbeiten mit Tritium ist mit beträchtlichen Isotopeneffekten zu rechnen. Diese sollten sich bei den hier in Frage kommenden Reaktionen so auswirken, daß wesentlich weniger Tritium als Wasserstoff aufgenommen, ein einmal fixiertes Tritium wegen der kleineren Spaltungsgeschwindigkeit einer C-T-Bindung gegenüber einer C-H-Bindung jedoch auch schwerer wieder aus den Zwischenprodukten entfernt wird. Zum Beispiel wird für ein GAP-2-T die Wahrscheinlichkeit zu DHAP isomerisiert zu werden, wesentlich geringer sein ($1/5 - 1/10$)^{8,9} als für einen nicht in 2-Stellung T-markierten Triosealdehyd. Diese Effekte wirken gegeneinander, wie sich z. B. aus dem Vergleich des T-Einbaus pro ¹⁴C bei der in vitro dargestellten PGS und der bei der Photosynthese gebildeten ersehen läßt. Weiterhin ist zu erwarten, daß sich ein Isotopeneffekt bei vollständiger Einstellung des Gleichgewichtes weit weniger auswirkt (= Gleichgewichts-Isotopeneffekt), als das bei einer irreversibel verlaufenden Reaktion oder einer Reaktion in einem Fließgleichgewicht der Fall ist (= kinetischer bzw. intramolekularer Isotopeneffekt).
2. Nach ROSE^{10,11} bzw. TOPPER¹² und ROSE⁸ verlaufen Triosephosphatisomerase-, Aldolase- und Hexosephosphatisomerase-Reaktionen stereospezifisch. Bei letzterer Reaktion konnte ROSE⁸ eine teilweise intramolekulare Protonenverschiebung, also keinen vollständigen Austausch mit dem Lösungsmittel, nachweisen.
3. Reaktionen, insbesondere Isomerisierungen, an bereits vorhandenen Zuckerphosphatpools bauen ebenfalls Tritium ein. Dies gilt besonders für Zuckerphosphatpools, die gar nicht am Photosynthesecyclus teilnehmen und auch nicht in Chloroplasten lokalisiert sind.

Die Größe der oben erwähnten Effekte auf die T-Verteilung nach der Photosynthese ist zunächst nicht abzuschätzen; ganz sicherlich werden sie jedoch zu einer mehr oder weniger weitgehenden Abweichung von den oben angegebenen Werten für PGS und FdiP führen.

Die Ergebnisse der Tab. 1 und 2 zeigen, daß das T/¹⁴C-Verhältnis z. T. geringer ist als erwartet und

	Tritiumverteilung in % nach Einwirkung von	
	Aldolase + Überschuß Triosephosphatisomerase auf FdiP (Ansatz 1)	Triosephosphatisomerase gefolgt von Aldolase auf Triosephosphate (Ansatz 2)
C-1	2,0	2,2
C-2	—	—
C-3	31,4	44,5
C-4	25,3	0,5
C-5	33,3	48,4
C-6	1,4	0,7
Summe des Abbaus	93,4	96,3

Tab. 4. Intramolekulare T-Verteilung in 2 enzymatisch tritium-markierten Fructosen aus FdiP (Einzelheiten siehe unter Methodik).

selbst nach langer Zeit, bedingt durch Isotopeneffekte, nicht das Verhältnis des Gleichgewichts erreicht. Das T/¹⁴C-Verhältnis des Gesamteinbaus und einiger Substanzen ist jedoch recht hoch, z. B. das der Saccharose und der Glykolsäure. Letzteres steht in Übereinstimmung mit den Befunden von CALVIN³.

Die in Tab. 3 zusammengefaßten Ergebnisse über die intramolekulare T-Verteilung in verschiedenen Hexosen zeigen im Gegensatz zur Erwartung einen hohen Tritiumgehalt an den oberen C-Atomen der Hexosen, der insbesondere im Falle der Fructose mit zunehmender Photosynthesezeit rasch abfällt. Hieraus muß man schließen, daß ein starker T-Einbau durch Isomerisierungsreaktionen auf der Stufe der Hexose-Phosphate stattgefunden hat. Dies ergibt sich ebenfalls daraus, daß bei kurzen Belichtungszeiten im wesentlichen nur eines der beiden nicht gleichwertigen H-Atome am C-1 der Fructose Tritium aufweist. Einen Beweis hierfür sehen wir in dem Abfall der Radioaktivität an C-1 bei der Osazonbildung (eingeklammerte Werte bei C-1 in Tab. 3) und unseren früheren Befunden⁷, wonach die Osazonbildung ebenfalls stereospezifisch verläuft und bevorzugt den durch Isomerisierung fixierten Wasserstoff an C-1 der Fructose abspaltet.

Daß die Summe der T-Aktivitäten an C-1 und C-2 der Glucose stets kleiner ist als der T-Gehalt an C-1 der entsprechenden Fructose, könnte auf einem kinetischen Isotopeneffekt beruhen.

⁸ I. A. ROSE u. E. L. O'CONNEL, J. biol. Chemistry **236**, 3086 [1961].

⁹ D. PALM u. H. SIMON, Z. Naturforsch. **18b**, 419 [1963].

¹⁰ S. V. RIEDER u. I. A. ROSE, J. biol. Chemistry **234**, 1007 [1959].

¹¹ I. A. ROSE u. S. V. RIEDER, J. biol. Chemistry **231**, 315 [1958].

¹² Y. A. TOPPER, J. biol. Chemistry **225**, 419 [1957].

Die T-Aktivität an C-3 der Hexose ist durchweg geringer als die an C-5. Wie Tab. 4 zeigt, führt der T-Austausch in FdiP in Anwesenheit von Aldolase und einem Überschuß an Triosephosphatisomerase zu einer annähernden Gleichverteilung in C-3 und C-5. Man sollte aus der Verschiedenheit der T-Aktivität von C-3 und C-5 in der Hexose auf eine geringere Triosephosphatisomerase- als Aldolase-Aktivität in der Photosynthese schließen. Zu diesem Schluß kam bereits RACKER^{12a} auf anderem Wege. Denn erst die Rückisomerisierung von DHAP zu GAP führt T-Aktivität an C-2 des G-3-P und damit an C-5 der Hexose ein. Die gefundene T-Aktivität in der Hexose der Photosynthese an C-5 ist jedoch größer als an C-3. Dies könnte durch einen kinetischen Isotopeneffekt der hauptsächlich in der Richtung von GAP zu DHAP verlaufenden Isomerisierung bedingt sein.

Das Tritium an C-2 des GAP stammt hauptsächlich aus einer an C-2 markierten PGS. Wie Tab. 6 zeigt, enthält die bei Belichtung von *Chlorella* in HOT gebildete PGS erhebliche Mengen Tritium an C-2 (0,26 bzw. 0,5 T/¹⁴C). Diese Aktivität kommt nur zu einem geringen Teil aus der Hydrolyse bei der Carboxydismutase-Reaktion.

Untersuchungen an isolierter Carboxydismutase ergaben nämlich nur einen Einbau von 0,12 T/¹⁴C an C-2 der PGS (Tab. 6). Daraus könnte man auf einen Isotopeneffekt (k_H/k_T) von 7–10 schließen. Die bei diesem Versuch gefundene T-Aktivität an C-3 (0,04 T/¹⁴C) stammt aus der Enolisierung von RudiP nach C-1 (s. Tab. 5). Diese Enolisierung ge-

schieht auch ohne Enzym, welches nur einen verstärkten Einbau von Tritium nach C-3 des RudiP katalysiert. Der verhältnismäßig geringe Gesamt-T-Einbau mit Carboxydismutase wurde schon von HURWITZ et al.¹⁴ festgestellt.

Ein sehr überraschender Befund ist die aus Tab. 3 ersichtliche Tatsache, daß die aus Stärke stammende Glucose bis zu Photosynthesezeiten von 20 Min. praktisch kein Tritium an C-2 besitzt und selbst nach 40 Min. der T-Gehalt an diesem C-Atom noch sehr gering ist. Daß dieses Ergebnis nicht auf einen Verlust während der sauren Hydrolyse der Stärke oder durch die Behandlung mit schwach basischem Ionenaustauscher zurückzuführen ist, wurde durch einen Gegenversuch, in dem nicht-markierte Stärke auf die gleiche Weise in HOT gespalten und aufgearbeitet wurde, kontrolliert.

Zur Deutung dieses Befundes nehmen wir an, daß bei der Isomerisierung von F-6-P zu G-6-P, welches dann zu Stärke umgewandelt wird, die Protonen des Wassers offensichtlich nicht beteiligt sind. Die von ROSE⁸ in vitro an einem isolierten Enzym gefundene partielle intramolekulare Wasserstoffübertragung müßte daher in der intakten Alge sogar vollständig intramolekular verlaufen. Diese Überlegungen gelten jedoch nur für die Isomerisierung jener Hexosen, die unmittelbar als Stärke abgelagert werden, im Gegensatz zu anderen freien Hexosephosphatpools der Zelle (evtl. außerhalb der Chloroplasten), die, wie die Versuche zeigen, in starkem Maße Tritium bei Isomerisierungen einbauen (s. z. B. C-2 der Glucose aus Monophosphaten bzw. aus Monophos-

Reaktionszeit [Min.]	RudiP mit Enzym 30		RudiP ohne Enzym 90		RudiP mit Enzym 90	
C-Atom der Ribulose	Tritium- verteilung [%]	T-Einbau aus HOT [%]	Tritium- verteilung [%]	T-Einbau aus HOT [%]	Tritium- verteilung [%]	T-Einbau aus HOT [%]
C-1	67,5	1,75	70,0	2,84	50,8	2,68
C-2	—	—	—	—	—	—
C-3	18,1	0,47	11,3	0,46	39,9	2,10
C-4	1,9	0,05	18,3	0,75	9,4	0,50
C-5	3,0	0,08				
Gesamt-T-Einbau in RudiP aus aus HOT in %		2,4		4,1		5,3

Tab. 5. Tritumeinbau in RudiP bei Inkubation mit und ohne Carboxydismutase in HOT.

^{12a} A. PETERKOVSKY u. E. RACKER, Plant Physiol. **36**, 409 [1961].

¹³ H. SIMON, H. D. DORRER u. K. H. EBERT, Z. Naturforschg. **18b**, 360 [1963].

¹⁴ J. HURWITZ, W. B. JACOBY u. B. L. HORECKER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **22**, 194 [1956].

Versuchsbedingungen	Reaktions- bzw. Belichtungszeit [Min.]	Verhältnis von T/ ¹⁴ C in PGS	Intramolekulare Verteilung von			
			¹⁴ C in PGS [%]		T in PGS [%]	
			C-1+C-2	C-3	C-2	C-3
RudiP + ¹⁴ CO ₂	30	0,17	—	—	—	—
+ Carboxydismutase			—	—	—	—
RudiP + ¹⁴ CO ₂	90	0,16	100,0	0,0	76,8	23,2
+ Carboxydismutase			69,2	30,8	52,2	47,8
<i>Chlorella</i>	5	0,98	71,0	29,0	46,3	53,7
<i>Chlorella</i>	2+	0,53				

Tab. 6. Vergleich des T/¹⁴C-Verhältnisses und der intramolekularen Verteilung von T und ¹⁴C in PGS, erhalten aus einer Carboxydismutase-Reaktion bzw. durch Photosynthese mit *Chlorella* unter verschiedenen Bedingungen. + Algen 10 Min. im Dunkeln mit HOT vorinkubiert.

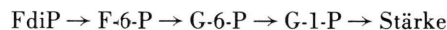
phaten und Saccharose nach 1, 2,5 und 5 Min.). Demnach wäre die Saccharose-Biosynthese unabhängig von der Stärke-Bildung.

HEBER¹⁵ konnte kürzlich, im Gegensatz zu Ergebnissen von STOCKING et al.¹⁶ wahrscheinlich machen, daß tatsächlich die Saccharose-Bildung außerhalb der Chloroplasten stattfindet.

Eine intramolekulare Protonenverschiebung bei der Isomerisierung jener Hexose-Phosphate, die zur Stärkebildung verwendet werden, reicht noch nicht zur Erklärung der geringen T-Aktivität an C-2 der Glucose aus Stärke aus. Denn es erhebt sich die Frage, warum kein Tritium von C-1 des F-6-P bei der Isomerase-Reaktion nach C-2 des G-6-P übertragen wird. Folgende Überlegungen könnten dies jedoch verständlich machen: Aus 6 Molekülen RudiP entstehen 6 Moleküle F-6-P, von denen jedoch 5 zu RudiP rückreagieren und nur eines zu G-6-P und damit zur Stärke (und zu Saccharose; aber dessen Bildung verläuft nach unseren Vorstellungen abgetrennt von der Stärke-Bildung!) weiterreagiert. Ein kinetischer Isotopeneffekt ist nur bei der Spaltung einer C-T-Bindung zu erwarten, was bei der Transketolase-Reaktion nicht der Fall ist, wohl aber bei der Isomerisierung des F-6-P, und zwar in der Größenordnung von $k_H/k_T = 5 - 7^8$. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein an C-1 (stereospezifisch) T-markiertes F-6-P-Molekül neben einem nicht markierten zu G-6-P umgewandelt wird, nur gering. (In unseren Versuchen kommen auf ein mit T markiertes F-6-P wesentlich mehr als nur 5 nicht markierte Moleküle.)

Ein T-markiertes F-6-P wird also bevorzugt eine Transketolase-Reaktion, die letztlich zu RudiP führt, eingehen. Deshalb sollte sich Tritiumaktivität in den Ribulosepools ansammeln. Dies könnte die Ursache des hohen T/¹⁴C-Verhältnisses in RudiP (s. Tab. 2) sein.

Zur Erklärung der Unterschiede in der oben erwähnten Isomerisierung des F-6-P zu Hexose der Stärke und der anderer Kohlenhydratpools möchten wir weiterhin die oft diskutierte Möglichkeit eines Multienzymsystems annehmen (s. hierzu l. c.¹⁷). In diesem Multienzymsystem würden mindestens folgende Schritte:



abgetrennt von analogen Reaktionen, etwa beim Kohlenhydratabbau, ablaufen.

Die „Fixierung“ der Substrate in diesem Multienzymsystem verhindert deren Austausch mit „freien“ Zuckerphosphat-pools. Die gefundene (Tab. 3) intramolekulare Verteilung von T in der Fructose aus F-6-P gibt deshalb nicht unbedingt die Verteilung jener Fructose wieder, die innerhalb des Multienzymkomplexes über G-6-P in Stärke umgewandelt wird.

Wahrscheinlich sind auch die vor dem FdiP stehenden Schritte, einschließlich der Carboxydismutase, in dieses Multienzymsystem einzubeziehen. Denn auch für die PGS wurde von KANDLER^{18, 19} bzw. HEBER¹⁵ nachgewiesen, daß verschiedene, voneinander unabhängige Pools bestehen. Auch BASSHAM^{17, 20} diskutiert einen Multienzymverband,

¹⁵ U. HEBER u. J. WILLENBRINK, *Naturwissenschaften* **50**, 506 [1963]; U. HEBER u. J. WILLENBRINK, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam], **82**, 313 [1964].

¹⁶ L. R. STOCKING, G. R. WILLIAMS u. A. ONGUN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 416 [1963].

¹⁷ J. A. BASSHAM, *Advances in Enzymol.* [1963].

¹⁸ O. KANDLER u. I. HABERER-LIESENKÖTTER, *Z. Naturforsch.* **18b**, 718 [1963].

¹⁹ O. KANDLER u. I. LIESENKÖTTER, *Microalgae and photosynthetic Bacteria*, The University of Tokyo-Press 1963, S. 513.

²⁰ J. A. BASSHAM u. M. KIRK, *Microalgae and photosynthetic Bacteria*, The University of Tokyo-Press 1963, S. 493.

in dem aus dem Anlagerungsprodukt von CO_2 an RudiP nicht 2 Mole PGS, sondern ein Mol PGS und ein Mol eines Triosephosphates entstehen sollen.

Die T-Verteilung in den Hexosen nach 40 Min. Photosynthese, insbesondere die der Glucose aus Stärke, unterscheidet sich nicht grundlegend von derjenigen nach 20, 10 oder 5 Min. Belichtungszeit. Sie dürfte daher wohl die endgültige „Gleichverteilung“ des Tritiums in den Hexosen darstellen, entsprechend den unterschiedlichen Isotopeneffekten bei den einzelnen Teilreaktionen. Dabei sollte man jedoch erwarten, daß sich, insbesondere bei längeren Photosyntheszeiten, Tritium der vorhergehenden Zyklen in den endständigen C-Atomen der Hexosen ansammelt, während die beiden mittleren C-Atome 3 und 4 lediglich das durch die Isomerisierung bzw. Reduktion eines einzigen Zyklus fixierte Tritium aufweisen. Daß nach längeren Zeiten offensichtlich keine besondere Benachteiligung dieser beiden mittleren C-Atome auftritt, ist nach dem CALVIN-Schema¹ nicht zu erwarten. Da bei dessen Gültigkeit an C-4 nur das durch Reduktion fixierte Tritium gebunden sein sollte, man aber bei dieser Reaktion mit einem merklichen Isotopeneffekt zu rechnen hat, sollte der T-Gehalt, insbesondere an C-4 bei längeren Belichtungszeiten, gegenüber den anderen C-Atomen abfallen.

Beschreibung der Versuche

1. Photosyntheseversuche

Die Photosyntheseversuche wurden mit der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa** durchgeführt. Eine 10-proz. Algen-Suspension (bezogen auf feuchte Zellen) wurde zwischen 10 und 30 Min. in Luft mit 30 000 Lux bei 25° vorbelichtet. Gleiche Vorbehandlung in N_2 ergab die „ CO_2 -verarmten“ Algen. Photosynthese-Aktivität und Proportionalität der Assimilation dieser Präparation wurden in Vorversuchen mit $^{14}\text{CO}_2$ geprüft.

Die mit HOT ausgeführten Versuche enthielten in einem Gesamtvolumen von 3 ml: 0,37 ml 10-proz. *Chlorella*-Suspension ($p_{\text{H}}=6$); 1 ml HOT (je nach Versuchsdauer 200–300 mC**); 0,1 ml Na-Bicarbonat (10 $\mu\text{Mol}/0,1 \text{ ml } p_{\text{H}}=7,8$). Das HOT wurde im Dunkeln zugesetzt, sofort (mit Ausnahme der Versuche mit Vorinkubation) das Bicarbonat durch eine Gummikappe auf einem Seitenstutzen des Gefäßes injiziert

und mit 50 000 Lux (Philips Atralux-Lampen) bei 25° belichtet. Nach den in den Tabellen angegebenen Belichtungszeiten wurde mit 0,1 ml 20-proz. Trichloressigsäure-Lösung gestoppt. Die Proben wurden in Zentrifugengläschen (zur Verminderung der Oberflächenspannung wurden einige Tropfen Methanol zugesetzt) gefriergetrocknet und zur Entfernung austauschbaren Tritiums 2-mal mit je 1 ml H_2O nachlyophilisiert. Dabei wurden die Gläschen mit etwas Quarzwatte verschlossen. Der Rückstand wurde nach Anfeuchten mit etwas H_2O in 1 ml 50-proz. Alkohol aufgenommen und in einem Aliquot (je nach Radioaktivität der Proben etwa 5–50 r) der Gesamt-T-Einbau bestimmt***.

2. Isolierung der Photosyntheseprodukte

Die Suspension wurde zentrifugiert und der Rückstand noch 2-mal mit 0,5 ml 50-proz. Äthanol in der Siedehitze extrahiert. 0,3 ml der vereinigten Lösungen wurden auf Schleicher & Schüll Chromatographiepapier (2040 b mit $\text{HCl}+\text{HF}$ gewaschen) in folgenden Lösungsmitteln zweidimensional chromatographiert: 1. Richtung: Phenol– H_2O 80 : 20; 2. Richtung: n-Butanol–Essigsäure– H_2O 52 : 14 : 35. Die Hauptmenge der löslichen Substanzen wurde eindimensional im Lösungsmittelsystem Butanol–Essigsäure– H_2O 52 : 14 : 35 + 10^{-3} m . AeDTE chromatographiert. Die Substanzen wurden durch Autoradiographie der auf dem gleichen Chromatogramm mitaufgesetzten Extrakten aus entsprechenden ^{14}C -Versuchen identifiziert.

Die vier unteren Zonen, die nach steigenden R_f -Werten die Zuckerdiphosphate, -monophosphate, die PGS und die Saccharose darstellen, wurden ausgeschnitten und mit Acetatpuffer ($p_{\text{H}}=5,3$; 5 $\mu\text{Mol MgCl}_2/\text{ml}$) eluiert. Die Phosphate wurden mit 1 Tropfen gereinigter Polidaselösung, die Saccharose mit 1 Tropfen Invertaselösung versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zur Entfernung der bei der Chromatographie der dephosphorylierten Substanzen störenden Salze und Proteine wurden die Lösungen mit einer Spatelspitze feuchtem Dowex 50 (H^+ -Form, ca. 500 mg) kurz geschüttelt und abzentrifugiert. Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2040 bM; Lösungsmittelsystem Phenol–Wasser 80 : 20 + 10^{-3} m . AEDTE, senkrecht zur Laufrichtung des Papiers. Nach Elution wurden die Kohlenhydrate im allgemeinen auf 2,5–3 mMol mit nicht-markiertem entsprechendem Zucker verdünnt (20–40 000 ipm/mMol) und dem chemischen Abbau (s. weiter unten) unterworfen.

3. Hydrolyse der Stärke²¹

Der Rückstand nach der Extraktion der löslichen Substanzen wurde mit 2 ml 2-n. H_2SO_4 1½ Stdn. in einem

* Herrn Prof. Dr. O. KANDLER sind wir für die Überlassung der Algen für einen Teil der Versuche zu Dank verpflichtet. Zu einem anderen Teil der Versuche wurden uns die Algen freundlicherweise von Herrn Prof. H. METZNER überlassen.

²¹ G. BILLEK u. H. KINDL, Atompraxis 8, 167 [1962].

** Wie von MOSES und CALVIN³ gezeigt, haben selbst T-Aktivitäten von 1000 mC/ml innerhalb der hier angewandten Belichtungszeiten keinen sichtlichen Einfluß auf die Photosynthese der Algen.

*** Alle T- und ^{14}C -Bestimmungen erfolgten im Gaszählrohr, teilweise unter Verwendung einer Antikoinzidenzanlage²⁰.

siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Verdünnen auf 10 ml und Zugabe von 5 mg Trägerglucose wurde das Hydrolysat mit 4 ml Amberlite IR 45 (OH-Form) 1 Stde. bis zum Neutralpunkt gerührt. Dann wurde filtriert, der Rückstand mit H₂O gewaschen und die so erhaltene Glucose-Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand der Gefrierdrying wurde in 1 ml H₂O aufgenommen und wie oben die freien Zucker der löslichen Fraktion chromatographiert (s. unter 2). In einem Versuch wurde kontrolliert, ob bei dieser Hydrolyse ein T-Austausch stattfindet. Dazu wurde analog mit nicht-markierter Stärke in HOT (40 mC/ml) hydrolysiert und zu der HOT-Lösung der Austauscher zugegeben. Es tritt keine Tritiumfixierung ein. Auch 4-stdg. Rühren von Glucose in HOT mit Amberlite IR 45 ergibt keinen Tritiumeinbau.

4. Einbau von Tritium in FdiP durch Isomerisierungs-Reaktionen

a) Der in Tab. 4 angegebene Ansatz 1 enthielt in 2,3 ml: 80 μ Mol Tris-HCl-Puffer ($p_H = 7,5$); 10 μ Mol FdiP-Mg-salz; 18 Einheiten Aldolase (Fa. Boehringer); 240 Einheiten Triosephosphatisomerase (Fa. Boehringer) und 60 mC HOT. Die Inkubationszeit betrug 30 Min. bei 20 °C. Nach dem Stoppen mit 0,2 ml Eisessig bei 80 °C wurde lyophilisiert und wie unter 2 dephosphoryliert und chromatographiert. Die so erhaltene Fructose enthielt 4 μ C Tritium.

b) Der in Tab. 4 angegebene Ansatz 2 enthielt in 3,5 ml: 60 μ Mol Tris-HCl-Puffer p_H 7,5; je 11 μ Mol der beiden Triosephosphate (Na-Salze der Fa. Boehringer); 18 Einheiten Triosephosphatisomerase (Fa. Boehringer) und 120 mC HOT. Der Ansatz wurde zunächst 25 Min. bei 20 °C inkubiert, dann 1,8 Einheiten Aldolase (Fa. Boehringer) zugegeben und weitere 10 Min. inkubiert. Dann wurde wie unter a) gestoppt und aufgearbeitet. Die gewonnene Fructose enthielt ca. 0,1 μ C T.

5. Tritium-Einbau in RudiP durch Carboxydismutase

Der Ansatz wurde bei 24 °C in Warburg-Gefäßen durchgeführt, die zur Entfernung des CO₂ ein mit 0,2 ml 20-proz. KOH-Lösung getränktes Filterpapier im Zentralgefäß enthielt. 4,1 ml Gesamtvolumen enthielten in μ Mol: Tris-HCl-Puffer ($p_H = 8,0$) 200; MgCl₂ 100; reduziertes Glutathion 20; RudiP 20; 360 ml HOT und 0,3 ml einer Carboxydismutase-Lösung (mit einer Aktivität von 2 μ Mol Umsatz pro ml und Min.). Nach den in Tab. 6 angegebenen Zeiten wurde mit 0,4 ml Eisessig gestoppt, eingefroren und zur Entfernung des HOT lyophilisiert. Das RudiP wurde mit 765 mg Ba-Acetat bei p_H 6,0 gefällt. Der Niederschlag wurde mit 25 ml 0,2-m. HCl behandelt, erneut mit Ba-Acetat bei p_H 6,0 gefällt und dieser Niederschlag analysiert.

²² J. HURWITZ, A. WEISSBACH u. B. L. HORECKER, J. biol. Chemistry **218**, 769 [1956].

²³ A. WEISSBACH, B. L. HORECKER u. J. HURWITZ, J. biol. Chemistry **218**, 795 [1956].

6. Einbau von Tritium in PGS durch Carboxydismutase

Die Reaktion wurde nach HORECKER et al.¹⁴ bei 24 °C durchgeführt. Der Ansatz enthielt in μ Mol: Tris-HCl-Puffer ($p_H = 8,0$) 50; MgCl₂ 25; RudiP 5; reduziertes Glutathion 5; NaH¹⁴CO₃ (mit 3,5 μ C) 20; 79 mC HOT und 0,75 ml Carboxydismutase. Nach 30 Min. wurde mit 0,1 ml Eisessig gestoppt, lyophilisiert und die PGS wie unter 5. als Ba-Salz gefällt und analysiert. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie.

Das in den Versuchen der Tab. 5 und 6 verwendete RudiP wurde nach HORECKER et al.²², die Carboxydismutase aus Spinat nach HORECKER et al.²³ (Anreicherung bis zur Stufe der Hitzeinaktivierung) hergestellt.

7. Beispiel zur Berechnung des Tritiumeinbaus pro ¹⁴C in die photosynthetischen Substanzen

In einem Versuch sei das Radioaktivitäts-Verhältnis von T/¹⁴C in den Substraten HOT und Bicarbonat-¹⁴C 1,35, das in einer photosynthetisch gewonnenen Substanz sei 0,5 (T/¹⁴C Substanz). Dieses Verhältnis gibt jedoch noch nicht das Verhältnis von fixiertem Wasserstoff aus dem Wasser zu fixiertem Kohlenstoff wieder, da ohne Berücksichtigung von Isotopeneffekten die Chance, daß aus dem HOT ein T fixiert wird, nur 50% ist. Der Wasserstoffeinbau pro ¹⁴C würde bei Vorliegen von TOT das Doppelte betragen, so daß

$$T/^{14}C \text{ (Substanz)} = 1,0.$$

Der Wasserstoffeinbau pro ¹⁴C beträgt demnach

$$\frac{T/^{14}C \text{ (Substanz)}}{T/^{14}C \text{ (Substrat)}} = \frac{1,0}{1,35} = 0,74 T/^{14}C.$$

8. Enzymatische Bestimmung von PGS

Die PGS wurde nach l. c.²⁴ enzymatisch zu GAP reduziert und der DPNH-Verbrauch durch die Extinktionsabnahme bei 340 m μ gemessen.

9. Messung der Carboxydismutase-Aktivität

Der Reaktionsverlauf bei der Messung der Carboxydismutase-Aktivität wurde durch Messung der aus ¹⁴CO₂ in PGS eingebauten Radioaktivität verfolgt. Die Reaktion wurde nach HORECKER et al.²³ durchgeführt.

B) Abbau der Zucker

Von den nach 2 angefallenen Lösungen wurde, z. T. durch Doppelbestimmung, die Ausgangsaktivität bestimmt. Da die zugesetzte Menge an nicht-markiertem Zucker die vom Papier eluierte mehrtausendfach übertrifft, kann aus dieser genau zugegebenen Menge und der Gesamttritium-Aktivität der Lösung die molare

²⁴ Methoden der enzymatischen Analyse, Ed. H. H. BERGMAYER, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., S. 227 [1962].

Aktivität des Zuckers bestimmt werden. Nach Gefrier-trocknung dieser Lösungen wurden die Phenylsotriazole dargestellt. Sodann wurde, von nachfolgend angegebenen Vorschriften abgesehen, zum Abbau nach l. c.^{13, 25} verfahren.

Zur Kontrolle von Austauschreaktionen und Isotopen-effekten wurden neben den in l. c.¹³ angegebenen Unter-suchungen noch folgende Experimente ausgeführt:

Die Ameisensäure wurde durch Wasserdampfdestil-lation aus der Lösung der Perjodatspaltung abgetrennt, nachdem vorher der Triazolaldehyd und Formaldehyd vollständig entfernt worden waren. Die Ameisensäure wurde titrimetrisch bestimmt und anschließend durch Eindampfen der Lösung als Na-Formiat isoliert. Ver-suche mit T- und ¹⁴C-markierter Ameisensäure zeigten, daß auch bei mehrmaliger Wasserdampfdestillation we-der ein T-Austausch stattfindet noch ein nennenswerter Isotopeneffekt auftritt.

Die Ausbeuten liegen pro Destillation bei 70 bis 75 Prozent.

Da die Perejodatspaltung des 6-0-Benzoyl-glucose-phenylsotriazols wegen der Gefahr einer hydrolyti-schen Abspaltung der Benzoylgruppe nicht vollständig durchgeführt werden kann, könnte ein sekundärer Iso-topeneffekt auftreten. Es ergab sich, daß ein meßbarer Effekt nicht auftritt.

Über die beim Arbeit mit Formaldehyd-T auftreten-den Effekte vgl. SIMON und HEUBACH^{26, 27}.

Um die Reinheit des nach der Perjodatspaltung (10 Min.) anfallenden Triazolaldehyds zu prüfen, wurde das Semicarbazon des Aldehyds dargestellt und mit dem rohen und dem umkristallisierten Triazol-aldehyd verglichen:

Triazolaldehyd (roh)	326 700 ipm/mMol,
Triazolaldehyd (umkristallisiert)	320 500 ipm/mMol,
Triazolaldehyd-Semicarbazon	319 300 ipm/mMol.

Zur getrennten Ermittlung des T-Gehaltes an C-4 und C-5 hat sich nach zahlreichen Versuchen die unter 12. beschriebene Arbeitsweise als am günstigsten er-wiesen. Diese Methode wurde durch Abbaueversuche ent-sprechend markierter Fructosen überprüft (vgl. die in Tab. 4 wiedergegebene T-Verteilung in Fructose-3.4.5-T und Fructose-3.5-T).

Gleichzeitig wurde hiermit nochmals geprüft, daß bei der Perjodatspaltung der Phenylsotriazole kein merklicher Isotopeneffekt auftritt.

Das Abbaufahren wurde an zahlreichen, nach WILZBACH direktmarkierten Hexosen und Pentosen über-prüft¹³.

10. Perjodatspaltung von Hexose-phenylsotriazol

64 mg (0,25 mMol) D-Glucose-phenylsotriazol, 201 mg (0,94 mMol) NaJO₄ und 6 ml Wasser wurden 20 Min. am Rückfluß unter Magnetrührung auf dem siedenden Wasserbad der Perjodatspaltung unterworfen. Die auf 0° gekühlte Reaktionslösung wurde vom

ausgeschiedenen N-Phenylsotriazolaldehyd abgesaugt und dies mit 1 ml kaltem Wasser gewaschen. Das Fil-trat wurde mit ca. 5 Tropfen 2-n. H₂SO₄ angesäuert und überschüssiges Perjodat und Jodat titrimetrisch durch Zugabe einer 1-n. Na₂SO₃-Lösung zerstört. Der Endpunkt wurde am Verschwinden der Jodfärbung er-kannt (ein Überschuß an Na₂SO₃ ist wegen des späte-ren Zusatzes von Silber-Ionen zu vermeiden). Nach er-folgt Reduktion wurde die Reaktionslösung mit 1-n. NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Zur Ent-fernung letzter Spuren N-Phenylsotriazolaldehyds wurde die Lösung 1-mal mit 10 ml und 2-mal mit je 5 ml Äther extrahiert.

11. Bestimmung von C-4 + 5 als Natriumformiat

Der nach der Abtrennung von C-6 bleibende weiße Salzurückstand wurde in 10 ml 0,2-n. H₂SO₄ aufgenom-men, in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben spatel-weise mit Ag₂SO₄ bis zum Klarpunkt der AgJ-Fällung versetzt. Dann wurde direkt in einen 100-ml-Zweihals-kolben überführt, der AgJ-Rückstand kurz mit 2 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat der Wasser-dampfdestillation unterworfen, wobei ca. 250 ml Destil-lat aufgefangen wurden. Die aufgefangene Ameisen-säure wurde mit CO₂-freier n/10-NaOH gegen Phenol-phthalein neutralisiert und danach die neutrale Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 23,5 mg = 70% d. Theorie.

12. Perjodatspaltung des 6-0-Benzoyl-D-glucose-phenylsotriazol

Zu 1 mMol 6-0-Benzoyl-D-glucose-phenylsotriazol (369 mg) wurde unter guter Magnetrührung eine heiße Lösung von 535 mg (2,5 mMol) NaJO₄ in 25 ml Was-ser gegeben. Auf dem siedenden Wasserbad wurde noch weitere 10 Min. (nicht mehr!) erhitzt, dann rasch unter fortwährender Magnetrührung auf 0° abgekühlt. Die abgekühlte Lösung wurde anschließend sofort mit 1-mal 20 ml, 2-mal 10 ml und 2-mal 5 ml Äther extrahiert, die Ätherphase dann mit geglühtem Na₂SO₄ getrocknet. Die wäßrige Phase wurde wie angegeben auf Ameisensäure weiterverarbeitet.

13. Isolierung des Benzoylglykolaldehyds und Fällung als 2.4-Dinitrophenylhydrazon

Die getrocknete Ätherlösung wurde ohne Zutritt von Feuchtigkeit auf ca. 20 ml eingengt, auf 5 Kieselgel-G-Platten (0,5 mm Schichtdicke) aufgetragen und in Benzol-Äthanol-Petroläther (40°-80°) (4:0,5:1) chromatographiert. Die unter einer UV-Lampe löschende Zone des Benzoylglykolaldehyds wurde abgenommen und 6-mal mit je 5 ml Äther extrahiert. Die Äther-lösung wurde dann zur Trockne eingedampft (bei ca. 30°-35°) und der Rückstand mit 80 mg 2.4-Dinitro-phenylhydrazin, 22 ml Äthanol und 2 ml Eisessig ver-

²⁵ H. SIMON, J. STEFFENS, Chem. Ber. **95**, 358 [1962].

²⁶ H. SIMON u. G. HEUBACH, Z. Naturforsch. **18b**, 160 [1963].

²⁷ H. SIMON u. G. HEUBACH, Z. Naturforsch. **18b**, 159 [1963].

setzt. Über Nacht kristallisierte bei Zimmertemperatur das orange-gelbe 2,4-Dinitrophenylhydrazon aus. Die Lösung wurde noch einmal kurz zum Sieden erhitzt, abgekühlt, abgesaugt und gut mit Alkohol gewaschen. Der rohe Niederschlag wurde anschließend nochmals kurz mit einer Lösung von 1 ml Eisessig in 10 ml Alkohol aufgekocht und dann gut mit Alkohol gewaschen.

Das so erhaltene Produkt hatte einen Schmp. von 183° – 184° und war im allgemeinen chromatographisch rein. War dies jedoch nicht der Fall, so wurde die in reinem Chloroform gelöste Substanz in Benzol dünn-schichtchromatographiert, die Hydrazon-Zone extrahiert und zur Trockne eingedampft. Gesamtausbeute: ca. 30% d. Theorie.

14. Abbau der Glycerinsäure

Der Abbau der Glycerinsäure erfolgte nach ARONOFF²⁸ durch Perjodatspaltung von Ca-Glycerat. Der Formaldehyd wurde als Dimedonderivat, die Glyoxylsäure als 2,4-Dinitrophenylhydrazon isoliert. Es ist wichtig, die Spaltung in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen vorzunehmen, da dadurch das entstehende Jodat ausfällt und somit die oxydative Decarboxylierung der entstandenen Glyoxylsäure verhindert wird (in einem Versuch wurde gezeigt, daß Jodat Glyoxylsäure decarboxyliert).

Die chromatographierte radioaktive Glycerinsäure wurde mit ca. 1,5 ml Wasser eluiert, mit 72 mg Ca-Glycerat (0,57 mMol Glycerinsäure) verdünnt, kurz

in der Wärme gelöst (radiochemische Homogenität!) und in Eis gekühlt. Dann wurde langsam unter gutem Rühren und Eiskühlung eine Lösung von 149 mg H_5JO_6 in 0,5 ml Wasser hinzuge tropft und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das entstandene Jodat und das überschüssige Perjodat wurden mit einer 1-m. Na_2SO_3 -Lösung reduziert und anschließend die Reaktionslösung mit 1-n. NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert.

Die Isolierung des Formaldehyds aus C-3 erfolgte nach l. c.^{26, 27}.

15. Isolierung von C-1 + 2 der Glycerinsäure als Glyoxylsäure-2,4-dinitrophenylhydrazon

Der nach der Abtrennung des Formaldehyds verbleibende weiße Rückstand wurde in 15 ml 0,5-n. HCl und 22 ml Wasser versetzt und 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Der Niederschlag des Hydrazons kristallisierte über Nacht im Kühlschrank aus. Ausbeute: 115 mg = 79% d. Theorie. Schmp. 193° .

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für ein Stipendium und Sachbeihilfe. Ferner wurde die Arbeit durch den Verband der Chemischen Industrie – Fonds der Chemie – unterstützt. Frl. H. PFLAUMER und Fr. E. WOLF führten zahlreiche Analysen mit großer Sorgfalt aus.

²⁸ S. ARONOFF, Techniques of Radiobiochemistry, The Iowa State College Press, S. 143 [1957].

²⁹ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959].