

281. Hans Gaffron: Über den Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung durch belichtete Farbstoffe, II. Mitteil.: Photoxydation im nahen Infrarot.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.]
(Eingegangen am 26. Juni 1935.)

Bei der Photoxydation organischer Substanzen durch Chlorophyll wird unter günstigen Bedingungen für jedes absorbierte Quant sichtbaren Lichtes unabhängig von der Wellenlänge 1 Mol. Sauerstoff verbraucht¹⁾. Es bildet sich ein mehr oder weniger stabiles Mol-Oxyd²⁾. Der Vorgang ist daher als eine Autoxydation zu betrachten, bei der die notwendige Aktivierungs-Energie vom angeregten Farbstoff geliefert wird³⁾. Die Energie der Licht-Quanten nimmt mit wachsender Wellenlänge ab. Verändern wir bei Photoxydations-Versuchen das wirksame Licht kontinuierlich in Richtung der größeren Wellenlängen, so muß der Augenblick eintreten, in dem die Energie der absorbierten Quanten kleiner wird, als die zur Autoxydation einer bestimmten Substanz notwendige Aktivierungs-Energie. Die Photoxydation wird dann auf einmal ausbleiben. Diese im Prinzip einfache Methode, um die Aktivierungs-Energie der Autoxydation organischer Körper zu messen und zu vergleichen, erfordert wirksame Farbstoffe, die im Rot und Ultrarot absorbieren, und einen in diesem Gebiet sehr leistungsfähigen Monochromator. Man kann aber zunächst einmal fragen, ob die Grenze der Photoxydations-Reaktionen am Ende des sichtbaren Spektrums oder darüber hinaus im Infrarot liegt. Zur Beantwortung dieser Frage ist Chlorophyll als Sensibilisator unbrauchbar, weil es bereits das sichtbare langwellige Rot nicht mehr absorbiert. Nun gibt es Organismen, die, wie die Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, Kohlensäure photochemisch reduzieren können⁴⁾ und dabei die Energie des infraroten Lichtes auszunutzen vermögen⁵⁾. Ich habe' aus Thiocystis, einem roten Schwefel-Bakterium, den wirksamen Farbstoff, das Bakterio-chlorophyll⁶⁾, das im Infrarot absorbiert, extrahiert und auf seine photochemische Wirksamkeit hin untersucht. Es zeigte sich, daß Lösungen von Bakterio-chlorophyll oder von Bakteriophäophytin ebenso wie Chlorophyll sensibilisierend wirken, und zwar auch im infraroten Licht. Eine Lösung dieser Farbstoffe in Aceton, die als Acceptor Thiosinamin enthielt, absorbierte bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen über 760 $\mu\mu$ lebhaft Sauerstoff. Dieses Ergebnis beweist, daß die Absorptionsgrenze des Chlorophylls im Rot sicher nicht die oben abgeleitete Grenze für solche photochemischen Reaktionen darstellt.

Auf Grund quantitativer Untersuchungen über die Photoxydation des Rubrens⁷⁾ bin ich vor 2 Jahren zu der Auffassung gekommen, daß die bei der Photoxydation vom sensibilisierenden Farbstoff absorbierte Energie nicht auf Sauerstoff, sondern auf den Acceptor übertragen wird⁸⁾, der dabei

¹⁾ B. 60, 755 [1927]. ²⁾ B. 60, 2229 [1927].

³⁾ H. Gaffron, Biochem. Ztschr. 264, 251 [1933].

⁴⁾ Van Niel, Arch. Mikrobiol. 3, 1 [1931]; H. Gaffron, Biochem. Ztschr. 260, 1 [1933]. ⁵⁾ H. Gaffron, Biochem. Ztschr. 269, 442 [1934], 275, 301 [1935].

⁶⁾ E. Schneider, Ztschr. physiol. Chem. 226, 221 [1934]; H. Fischer u. J. Hasenkamp, A. 515, 148 [1935].

⁷⁾ Vergl. die bekannten Arbeiten von Ch. Moureu, Ch. Dufraise und Mitarbeitern in den Compt. rend. Acad. Sciences 182, 1440 [1926] u. ff.

⁸⁾ Biochem. Ztschr. 264, 251 [1933].

in einen langlebigen aktivierten Zustand übergeht. Zur gleichen Zeit hat H. Kautsky eine Arbeit veröffentlicht⁹⁾, in der er meine früheren Versuche über Photoxydation durch Chlorophyll mit der Bildung eines metastabilen Zustandes des Sauerstoffs zu erklären versucht. Den Widerspruch zwischen seiner Hypothese und meinen Messungen sucht Kautsky jetzt zu überbrücken, indem er eine metastabile Aktivierung des Farbstoffes der metastabilen Aktivierung des Sauerstoffes vorangehen läßt¹⁰⁾, eine Möglichkeit, die durch seine interessante Entdeckung des Nachleuchtens der Farbstoffe in Flüssigkeiten zunächst plausibel erscheint.

Unabhängig von mir und auf einem anderen Wege sind neuerdings J. Franck und H. Levy¹¹⁾ auch zu der Auffassung einer Aktivierung des Acceptors (unter Bildung eines Radikals) gekommen. Trotzdem bleibt Kautsky bei seiner Ansicht¹²⁾ und präzisiert sie dahin, daß die Aktivierung des Sauerstoffes bei der Photoxydation gleichbedeutend sei mit der Anregung im $^1\Sigma$ -Zustand, die etwa 37000 cal. erfordert, und einer Wellenlänge von 762 $\mu\mu$ entspricht.

Der hier beschriebene Versuch zeigt, daß man Photoxydation mit Licht-Quanten erhält, die kleiner sind, als sie zur Anregung des Sauerstoffes notwendig wären, eine sehr einfache Bestätigung der Theorie der Aktivierung des Acceptors.

Beschreibung der Versuche.

Extrahiert man aus Thiocystis-Bakterien das Bakterio-chlorophyll mit Alkohol, so sieht die Lösung im gewöhnlichen Licht sehr ähnlich wie eine Chlorophyll-Lösung aus. Der Unterschied in der Absorption wird deutlich, wenn man beide Lösungen nebeneinander durch ein Rotfilter betrachtet, das, wie RG 8 oder RG 9 von Schott & Gen., Jena, gerade noch das Ende des sichtbaren Spektrums um 750 $\mu\mu$ durchläßt. Die Bakterio-chlorophyll-Lösung erscheint schwarz, während die Chlorophyll-Lösung aus grünen Pflanzen vollkommen durchsichtig ist. Das Bakterio-chlorophyll ist an der Luft sehr unbeständig und verliert rasch seine Fähigkeit, im Infrarot zu absorbieren. Für photochemische Versuche ist daher das magnesium-freie Bakterio-phäophytin geeigneter, da es erheblich haltbarer ist. Zur Darstellung dieses Körpers in größeren Mengen verweise ich auf die Vorschriften von H. Fischer und J. Hasenkamp (l. c.). Hat man nur kleine Bakterienmengen zur Verfügung, so ist folgendes Verfahren praktisch:

Man verreibt die auf der Zentrifuge gewaschenen Bakterien mit dem 3-fachen Volumen Alkohol und verrührt die entstandene Suspension mit der 10-fachen Menge einer Mischung von 3 Tln. absol. Alkohol und 1 Tl. absol. Äther. Nach 30 Min. saugt man auf der Nutsche ab und engt das Filtrat auf die Hälfte seines Volumens im Vakuum ein, wobei der ganze Äther verjagt wird. Die alkohol. Lösung der Farbstoffe versetzt man mit 1% rauchender Salzsäure und gibt vorsichtig solange Wasser hinzu, bis die Farbstoffe flockig ausfallen. Man trennt auf der Zentrifuge und wäscht mehrmals mit 50-proz. Alkohol. Der Niederschlag wird in wenig heißem 96-proz. Alkohol aufgeschlämmt und auf die bereits mit Alkohol getränkte Talkum-Schicht eines etwa 10 cm hohen

⁹⁾ H. Kautsky, H. de Bruijn, R. Neuwirth u. W. Baumeister, B. 66, 1598 [1933].

¹⁰⁾ H. Kautsky, A. Hirsch u. W. Flesch, B. 68, 152 [1935].

¹¹⁾ J. Franck u. H. Levy, „Beitrag zur Untersuchung der Fluoreszenz in Flüssigkeiten“. Ztschr. physik. Chem. (B) 27, 409 [1935].

¹²⁾ H. Kautsky, Naturwiss. 23, 389 [1935]; H. Kautsky u. A. Hirsch, Biochem. Ztschr. 278, 374 [1935].

genügend breiten Rohres zur chromatographischen Analyse nach Tswett-Winterstein gebracht. Die Farbstoffe werden mehrmals mit heißem Alkohol ausgezogen, wobei nur wenig Bakterio-phäophytin in Lösung geht. Jetzt werden die Farbstoffe in der Talkum-Röhre mit Aceton voneinander getrennt. Nach 2—3-maliger chromatographischer Reinigung erhält man das Bakterio-phäophytin mit schöner, grünlich-violetter Farbe. Diese Lösung wird auf ein kleines Volumen gebracht und kann so für photochemische Versuche verwendet werden.

Die manometrische Versuchs-Anordnung und die Zusammensetzung der Acceptor-Lösung (Thiosinamin) ist an anderer Stelle beschrieben worden²⁾. Als Lichtquelle genügt eine gewöhnliche Metallfaden-Lampe von 60—100 Watt Stromverbrauch. Mit passenden Linsen stellt man ein annähernd paralleles Lichtbündel her, um es bequem filtrieren zu können, und bestrahlt damit das im übrigen gegen Tages- und Streulicht abgeschirmte Manometer-Gefäß. Als Licht-Filter verwende ich Farbgläser von Schott & Gen., Jena, deren Durchlässigkeit in den verschiedenen Spektralgebieten bekannt ist. Nach Angaben der Fabrik ergeben sich für Filter BG 3 im Rot und Infrarot folgende Durchlässigkeits-Zahlen (ohne Reflexion).

Bezeichnung der Filter	Wellenlänge in $\mu\mu$					
	644	700	730	775	850	950
B G 3 3 mm dick	0	0	0.49	0.73	0.94	0.90

Zwischen Filtern und der Lichtquelle empfiehlt sich, eine Cuvette mit wäßriger Tartrazin-Lösung einzuschalten, um eine Erwärmung der Filter zu verhindern, und um blaues Licht, das von BG 3 durchgelassen wird, zu absorbieren.

Das Ergebnis der Belichtung einer mit Bakterio-phäophytin sensibilisierten Thiosinamin-Lösung, die sich bei 20° mit dem Sauerstoff der Luft im Gleichgewicht befand, ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Filter	Durchlässigkeiten einschl. Reflexionsverlusten (Rd = 0.92)		Photoxydation $\left(\frac{\text{mm}^3 \text{ O}_2 \text{ absorbiert}}{t = 4 \text{ Min.}}\right)$
	760 $\mu\mu$	850 $\mu\mu$	
1. ein Glas B G 3, 3 mm ..	0.58	0.86	92
2. zwei Gläser B G 3, 6 mm.	0.34	0.74	72

Die durch das Filter B G 3, 3 mm, hindurchgelassene Strahlung enthält einen kleinen Anteil an Licht der Wellenlängen 710—760 $\mu\mu$. Da dieses Licht von Bakterio-phäophytin stark absorbiert wird, könnte man versucht sein, den kurzwelligeren Teil der Strahlung für die gesamte photochemische Wirkung verantwortlich zu machen. Man braucht jedoch nur das Filter B G 3 zu verdoppeln, um die Unrichtigkeit einer solchen Annahme zu beweisen. Aus den Durchlässigkeiten und dem allgemeinen Reflexionsverlust von 8% ergibt sich, daß ein zweites Filter von dem Licht der Wellenlänge $\lambda = 760 \mu\mu$ 41%, von $\lambda = 775 \mu\mu$ 33% und von $\lambda = 850 \mu\mu$ 14% absorbieren muß. Die gemessene photochemische Wirkung fällt um 22%, was etwa einer Wellenlänge von $\lambda = 800 \mu\mu$ entsprechen würde. Demnach ist der größte Teil der wirksamen Strahlung sicher langwelliger als 760 $\mu\mu$.