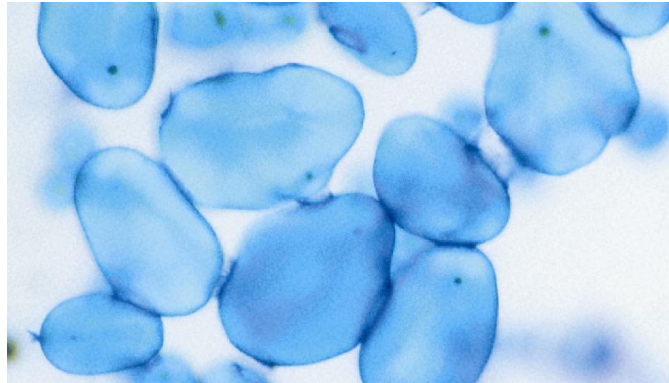


## Stärkesynthese



### EINLEITUNG

Üblicherweise wird im Biologieunterricht die Stärke-Zersetzung durch Speichel im Zusammenhang mit verschiedenen Themen behandelt: leider bleiben die Vorstellungen der Schüler bezüglich des Abbaus von Stoffwechselprodukten (Katabolismus) trotzdem recht vage.

Ein einfacher Versuch zum Anabolismus kann zudem die erforderlichen Vorstellungen zum Stoffwechsel vervollständigen. Dieses Experiment spricht beide energetische Veränderungen an.

#### Katabole Reaktionen sind:

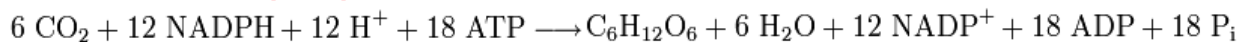
- Hydrolysereaktionen;
- Exo-energetische Reaktionen, also Reaktionen die spontan ablaufen: Bildung von Stoffen deren potentielle chemische Energie geringer ist.

#### Anabole Reaktionen sind:

- Synthesereaktionen;
- Endo-energetische Reaktionen, also Reaktionen die nicht spontan ablaufen: zur Bildung von Stoffen wird eine Energiezufuhr benötigt. Die potentielle chemische Energie der entstandenen Produkte ist höher. Die Energiezufuhr wird durch ein spezialisiertes Molekül gewährleistet: das ATP.

#### Schritte der CO<sub>2</sub>-Synthese aus Stärke

Grüne Pflanzen benötigen in der Dunkelphase der Photosynthese CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle für die Biosynthese von Glucose. Im Calvin-Zyklus wird für jedes fixierte CO<sub>2</sub>-Molekül ein Molekül Ribulose-1,5-Diphosphat benötigt. Die Gleichung dieses komplexen Zyklus lässt sich folgendermaßen aufstellen:

**6 Ribulose-1,5-Diphosphat****6 Ribulose-1,5-Diphosphat**

Am Ende des Zyklus wird das Ribulose-1,5-Diphosphat-Molekül wieder regeneriert.

Die so entstandene Glucose ist Ausgangsprodukt für die Kohlenhydratproduktion bei Pflanzen:

- Saccharose (Transportzucker)
- Zellulose (Strukturpolysaccharid)
- Stärke (Speicherpolysaccharid)
- 

(Tiere benutzen andere Stoffwechselwege um  $\text{CO}_2$  zu binden und Glucose zu synthetisieren.)

**I N H A L T****Notwendige Produkte zur Stärkesynthese**

Glucose:	10 g
Glucose-1-P:	1 g
Lösliche Stärke:	10 g
Kaliumdihydrogenphosphat :	10 g
Lugolsche Lösung:	30 cl

**Notwendiges Zubehör**

Für die Makromethode:

- Reagenzgläser, 10 Stück
- Platte zum Färben, 5 Stück
- Tropfpipette (3 ml), 50 Stück
- Tropfpipette (1 ml), 50 Stück

Für die Mikromethode:

- Platte zur Mikrotitration, 10 Stück
- Mikropipetten (5-50  $\mu\text{l}$ )
- Mikropipetten (50- 200  $\mu\text{l}$ )
- Spitzen für die Mikropipetten, 1000 Stück
- kapillare Mikropipetten, 250 Stück mit Sauger
  - 100  $\mu\text{l}$
  - 25  $\mu\text{l}$
  - 10  $\mu\text{l}$

**Zusätzliches Zubehör**

- Präzisionswaage, 0,01 g
- Reagenzglas-Set (6 Reagenzgläser ø 12mm)
- Messbecher (250 ml)
- Trichter ø 75 mm
- Filter
- Büchner-Trichter
- Filter für den Büchner-Trichter
- Wasserstrahlpumpe

**VERSUCHSPRINZIP**

Es soll versucht werden Glucose-1-P aus Kartoffeln unter Einsatz von Enzymen herzustellen.

Mittels Jod-Wasser wird die Stärkebildung nachgewiesen. Um die Spezifität der Enzymreaktion darzustellen, werden die Proben gleichzeitig mit verschiedenen Vergleichsproben durchgeführt.

**Methoden**

Zwei Arbeitsweisen:

- Klassische Methode, bei der Reagenzgläser benutzt werden (Makromethode).
- Kostengünstige moderne Methode (Mikromethode).

Die Mikromethode ermöglicht beachtliche Ersparnisse (es sind 15 praktische Übungen zur Stärkesynthese mehr bei gleicher Ausgangsmenge durchführbar).

**DURCHFÜHRUNG****Vorbereitung der Lösungen****Makromethode:**

- 0,2%ige Glucoselösung: 0,4 g Glucose werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst
- Glucose 1P-Lösung (0,25 %): 0,25 g werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst
- Stärkelösung (0,2 %): 0,4 g werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (0,2M): 5,4 g werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst

**Mikromethode:**

Herstellen von 1/15 der gleichen Lösungen im Vergleich zur Makromethode.

**Aufteilen der Lösungen für jede Schülergruppe.****Makromethode:**

1. Reagenzglas: 3 ml Glucoselösung
2. Reagenzglas: 3 ml Stärkelösung
3. Reagenzglas: 3 ml Glucose1P-Lösung
4. Reagenzglas: 1,5 ml Glucoselösung und 1,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung
5. Reagenzglas: 3 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung

### Markieren der Reagenzgläser.

#### Mikromethode:

Mittels einer Mikropipette werden in die erste Spalte einer Mikrotitrationsplatte folgende Proben gefüllt:

1. Reihe: 200  $\mu\text{l}$  Glucoselösung
2. Reihe: 200  $\mu\text{l}$  Stärkelösung
3. Reihe: 200  $\mu\text{l}$  Glucose1P-Lösung
4. Reihe: 100  $\mu\text{l}$  Glucoselösung und 100  $\mu\text{l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung
5. Reihe: 200  $\mu\text{l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung

Markieren der Reihen.

### Vorbereitung des Enzymextrakts

300 bis 400 g Kartoffeln schälen, in Stücke schneiden (so schnell wie möglich). Bei der Benutzung von Mikrovolumina reicht eine Kartoffel aus.

- in eine Zentrifuge geben
- Auffangen des Safts, filtrieren (feiner Trichter und Filter)
- bei der Benutzung eines Zerkleinerers oder Mixers muss eventuell mit destilliertem Wasser verdünnt werden (1/4 bis 1/3 der Masse)
- Auffangen des Safts; filtrieren durch den Büchner-Filter
- falls notwendig, müssen diese Schritte mehrmals durchgeführt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine zerkleinerten Stücke in das Filtrat gelangen.

Um die Oxidation so gering wie möglich zu halten, darf der Enzymextrakt so wenig wie möglich mit der Luft in Kontakt kommen. Der Saft verfärbt sich mit der Zeit braun, bleibt aber ungefähr eine Stunde lang aktiv.

### Versuchsdurchführung durch den Schüler

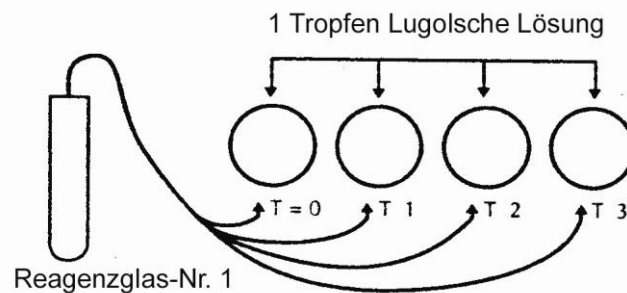
#### Makromethode:

- Mittels einer Tropf-Pipette werden in jedes Reagenzglas 2 bis 3 ml (je nach der filtrierten Menge) des Extrakts aus dem Kartoffelsaft gegeben.

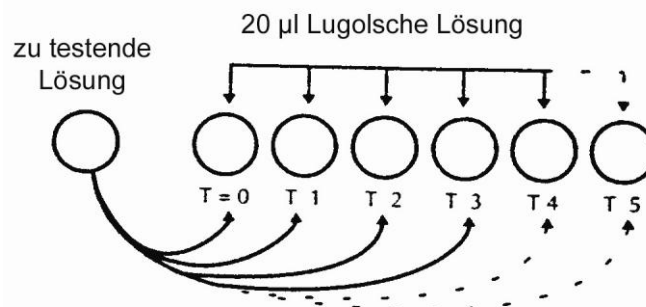
- Jede Minute werden etwa 0,5 ml aus dem Reagenzglas Nr.1 entnommen und auf eine Vertiefung der Färbplatte, die bereits einen Tropfen Lugolsche Lösung enthält, gegeben. Notieren der Zeiten.
- In gleicher Weise mit den Reagenzgläsern 2-5 verfahren.

**Mikromethode:**

- Mittels einer Mikropipette werden in jede Vertiefung der ersten Spalte auf der Mikrotitrationsplatte 100 µl des Enzym-Extrakts aus dem Kartoffelsaft gefüllt.
- Jede Minute werden 50 µl der Lösung aus der Alveole in der ersten Reihe entnommen und in die Alveolen der gleichen Reihe gegeben, die je 10 µl Lugolsche Lösung enthalten. Notieren der Zeiten.
- In gleicher Weise mit den Lösungen der Reihen 2 bis 5 verfahren.



Fakultativ: Zum Zeitpunkt  $t=0$  sowie zum Ende des Versuchs kann mit den Inhalten aller Reagenzgläser ein Test mit Fehling-Reagenz durchgeführt werden. Dazu zum Sieden bringen, bzw. in ein Wasserbad mit kochendem Wasser geben.



Fakultativ: Im Reagenzglas kann ein Test mit Fehlingreagenz (100 µl Flüssigkeit mit 100 µl Fehlingreagenz) durchgeführt werden. Zum Sieden bringen bzw. in ein Wasserbad mit kochendem Wasser geben.

## Anmerkungen

Der Wert der Tests begründet sich darin, dass:

- festgestellt wurde, dass nicht alle Kartoffelsorten gleich reagieren.
- bei einer Kartoffelsorte unterschiedliche Ergebnisse festgestellt werden können, je nach Jahreszeit und Stoffwechsel der Knollen.
- die Gewinnung und Verdünnung des Kartoffelextrakts ein wesentlicher Einflussfaktor darstellt (Erhalt der Qualität und Menge des Enzyms).
- ermöglicht wird, Zeiten zu bestimmen, die die Enzymlösungen zur Stärkesynthese benötigen (Hinweis auf Enzymkonzentration und -aktivität mit Lugolscher Lösung).

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden in einer Tabelle zusammengefasst. Obwohl bei den durchgeführten Experimenten verschiedene Parameter verändert wurden, zeigt der Vergleich der Protokolle, dass die Stärkesynthese nur unter Anwesenheit von Enzymen aus dem Ausgangsstoff Glucose-1-Phosphat ablaufen kann.

## Anmerkungen

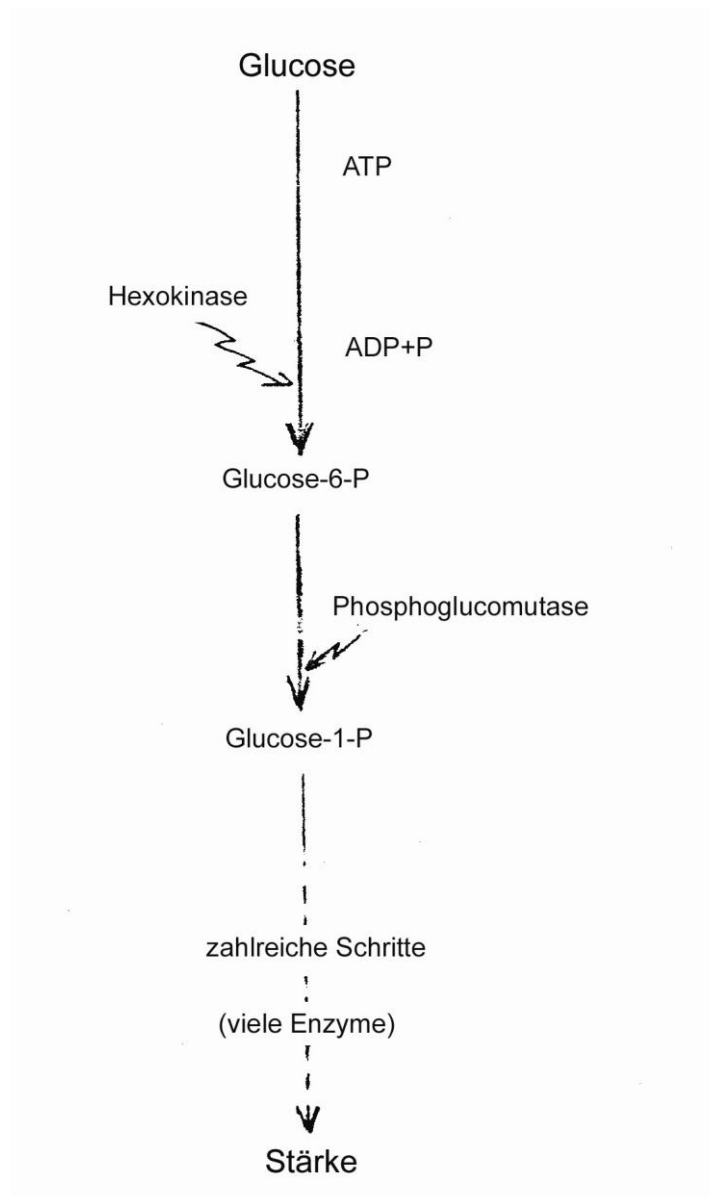
- Der Schüler weiß, dass die Kartoffelknolle Stärke enthält (Speicherort).  
*Die Frage "Was enthält der Kartoffelsaft?" wird vermutlich während des Versuchs von einem Schüler gestellt werden. Es scheint insofern nicht erforderlich zu sein, von vorneherein die Abwesenheit von Stärkekörnern in dem Kartoffelextrakt zu begründen.*  
*Der Schüler selbst oder der Lehrer führt den einfachen Versuch durch, einige Tropfen Lugol'scher Lösung zu dem Kartoffelsaft-Extrakt hinzuzugeben. Bei richtiger Durchführung hat der Filter das Durchkommen von Stärkekörnern verhindert und die Lugol'sche Lösung reagiert nicht.*
- Die Reaktionen zur Sichtbarmachung der Stärkesynthese sind reversibel und stabil. Dies erklärt, dass ab Versuchsbeginn eine deutliche Stärkesynthese feststellbar ist und dass die Färbung durch die Lugol'sche Lösung immer klarer wird. Amylopektin, Amylose und andere Stärkebestandteile können identifiziert werden.
- Es ist wichtig die unterschiedlichen Versuchsbeschreibungen zu beachten: Solches rechtfertigt insbesondere die Nutzung der Mikrotiterplatte oder einer Lochplatte.
- Eine genaue Messung zum Versuch kann mittels eines Colorimeters/ Spektralphotometers (vgl. Conatex-Produkt) erfolgen. Die Entwicklung kann nicht fortlaufend vonstatten gehen, weil die Lugol'sche Lösung die Reaktion merklich blockiert bzw. abbremst. Eine Reaktionskurve zur Synthese in Abhängigkeit von der Zeit wird gezeichnet und stellt die Reaktionskinetik des Enzyms dar.
- Fakultativ: Wenn der Saft der Kartoffeln sehr schnell oxidiert, können wenige Tropfen Zitronensäure (Anti-Oxidans) zugegeben werden. Es lässt sich fast sofort eine Farbveränderung feststellen, da die Reaktion der Stärke durch die Säure gebremst wird.
- Zu Beginn des Versuchs erscheinen bei Zugabe Lugolscher Lösung kleine blauschwarze Körner, die nicht weiter stören sollen. Sie entwickeln sich aufgrund mehrerer Ursachen und bleiben während des Versuchs erhalten. Nur das

Reagenzglas mit Glucose-1-Phosphat und dem Kartoffelsaft-Extrakt entwickeln sich deutlich bei der Stärkesynthese.

- Während der Extraktion des Kartoffelsafts erleichtert und beschleunigt eine Zentrifuge den Versuchsablauf.

## Anhang

Die Stärkesynthese kann folgendermaßen zusammengefasst werden:



Die natürliche Stärke besteht aus Amylose und Amylopektin. Amylose besteht aus Ketten mit ungefähr 250 – 300 alpha-Einheiten D-Glucopyranose, die mit 1-4-Bindungen verbunden sind.

Amylopektin ist ein verzweigtes Molekül. Jede Verzweigung besteht aus 20 bis 24 Glucosid-Einheiten, die über 1-4-Bindungen verbunden sind. Die Verbindungen zwischen den Ketten sind 1-6-Bindungen. Stärke ist das Endprodukt zahlreicher chemischer Reaktionen. Dieser Versuch ermöglicht es, die Bedingungen für ihre Synthese zu bestimmen.