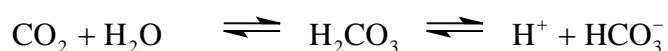


Gruppe 10 – vorgegebener Versuch

Die Wirkung der Carboanhydrase

Reaktion:



Zeitbedarf:

Vorbereitung: 30 min
 Versuchsdurchführung: 60 min
 Nachbereitung: 30 min

Chemikalien:

Chemikalien	Summenformel	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbole	Schuleinsatz (HessGiss)
Frisches Rinder- oder Schweineblut	-	ca. 100 mL	-	-	-	S 1
Ethanol-Wasser-Lösung (4:6)	C ₂ H ₅ OH · aq	2,5 mL	11	7-16	F	S 1
Kochsalz-Lösung (w = 0,9 %)	NaCl · aq	4 mL	--	-	-	S 1
Trichlormethan (Chloroform)	CHCl ₃	1 mL	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn	Keine Schülerexperimente erlaubt. (*)
Phenolrot	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S	1,25 mg	36/37/38	26-36	Xi	S 1

Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3	2,2 g	-	22-24/25	-	S 1
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5,3 g	-	-	-	S 1
Kohlensäurehaltiges Mineralwasser	" H_2CO_3 "·aq	10 mL	-	-	-	S 1

(*) Ersatzstoffprüfung ist besonders wichtig.

Geräte und Materialien:

- 5 x Bechergläser (ca. 100 mL)
- 2 x Reagenzgläser
- 2 x Zentrifugengläschen
- 2 x Gummistopfen (passend zu den Zentrifugengläschen)
- 5 x Spritzen (2 x 2 mL, 1 x 5 mL, 2 x 10 mL) mit Kanüle
- Zentrifuge
- Luftdichtes Aufbewahrungsgefäß für das Blut (ca. 100 mL)

Versuchsaufbau:



Abb. 1: Vorbereitetes Schweineblut sowie die Komponenten der Pufferlösung, die Phenolrot-Lösung, die Ethanol-Wasser-Lösung, die physiologische Kochsalzlösung, Trichlormethan und zwei Zentrifugengläschen.

Versuchsdurchführung:

a) *Enzymisolation aus Erythrocyten*

6 mL Blut werden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrocyten im Zentrifugat werden in 4 mL physiologischer Kochsalzlösung erneut aufgeschwemmt und wieder zentrifugiert. Der Überstand wird abermals verworfen. Zu den Erythrocyten im Zentrifugat werden 2,5 mL der wässrigen Methanol-Lösung (4:6) und 1 mL Chloroform gegeben. Dann wird kräftig geschüttelt. Danach wird erneut zentrifugiert. Die Carboanhydrase befindet sich dann im Überstand, der mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden kann.

b) *Lösungen für den Enzymtest*

Für die Indikatorlösung werden 1,25 mg Phenolrot und 21,8 mg Natriumhydrogencarbonat in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst. Für den Puffer werden zunächst in einem Becherglas 2,2 g NaHCO_3 in 24 mL entionisiertem Wasser gelöst (Lösung A). Anschließend werden in einem weiteren Becherglas 5,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 40 mL entionisiertem Wasser gelöst (Lösung B). Der Puffer wird nun durch Zusammengießen von 20,6 mL der Lösung A und 30 mL der Lösung B hergestellt. Die so entstehende Lösung wird mit entionisiertem Wasser auf 100 – 200 mL aufgefüllt.

c) *Enzymtest*

In zwei Reagenzgläser wird jeweils

- 1) 1 mL Phenolrot-Lösung, 0,5 mL Puffer und 1 mL Enzymlösung
- 2) 1 mL Phenolrot-Lösung, 0,5 mL Puffer und 1 mL entionisiertes Wasser

gegeben.

Dann werden möglichst gleichzeitig und gleichmäßig je 5 mL kaltes kohlensäurehaltiges Mineralwasser dazugegeben.

Beobachtungen:

a) *Enzymisolation aus Erythrocyten*

Nach der Zugabe der wässrigen Methanol-Lösung verklumpten die Erythrocyten und klebten am Boden des Zentrifugenglases fest. Die Lösung, die das Enzym enthielt war leicht gelbbraun gefärbt und trübe.

c) *Enzymtest*

Nachdem die Phenolrot-Lösung und die Pufferlösung zusammengegeben wurden, färbte sich das Gemisch violett. Es lag eine klare Lösung vor.

- 1) Nach Zugabe des isolierten Enzyms in das Reagenzglas 1) färbte sich diese Lösung leicht rosa. Zudem wurde sie durch die Enzymprobe etwas getrübt.
- 2) Auch nach Zugabe des Wassers in das Reagenzglas 2) blieb die Lösung violett gefärbt und klar.

Nach der gleichzeitigen, tropfenweisen Zugabe von je 5 mL gekühlten, Kohlensäurehaltigen Mineralwassers konnten folgende Beobachtungen gemacht werden.

- 1) Sobald die ersten Tropfen in das Reagenzglas gelangten färbte sich die gesamte Lösung gelblich.
- 2) Beim Zutropfen des Mineralwassers verfärbte sich die Lösung ganz allmählich von violett nach gelb. Am Reagenzglasboden war die Lösung auch 2 min nach den ersten Wassertropfen noch violett gefärbt. Schließlich färbte sich auch diese Lösung vollständig gelb.

Insgesamt geschah der Farbwechsel von rosa bzw. violett nach gelb im Reagenzglas 1) binnen Sekunden, während er sich im Reagenzglas 2) innerhalb von Minuten vollzog.

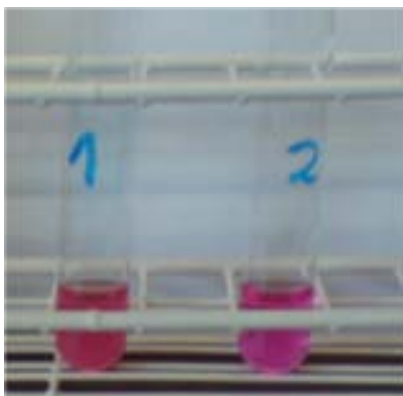


Abb. 2: Vorbereitete Lösungen vor Zugabe des Mineralwassers.

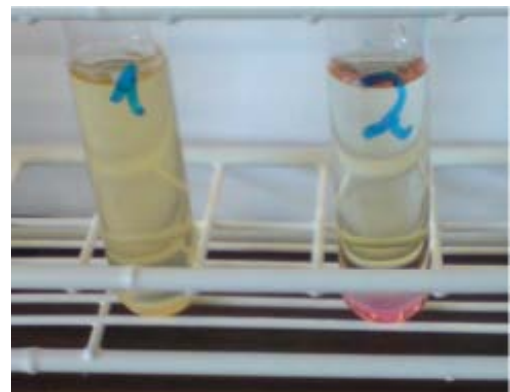


Abb. 3: Lösungen nach Zugabe des Mineralwassers. Die Lösung im Bodenbereich von Reagenzglas 2 ist noch leicht violett gefärbt, während Lösung 1 bereits gelb gefärbt ist.

Entsorgung:

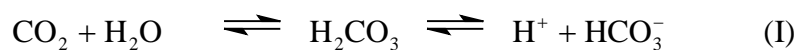
Alle Lösungen wurden neutral in den Sammelbehälter für organische Lösungsmittelabfälle gegeben, da sie entweder in Kontakt mit dem Chloroform standen oder die Indikatorlösung enthielten. Das nicht benötigte Blut wurde mit Wasser verdünnt und in den Ausguss entsorgt.

Fachliche Analyse:

Um den menschlichen Körper mit Energie zu versorgen, bedarf es biochemischer Prozesse, die grob unter dem Begriff der Zellatmung zusammengefasst werden können. Für die Zellatmung wird neben einem Energieträger, meist Glucose, auch elementarer Sauerstoff benötigt. Der Sauerstoff wird der Luft in den Lungenbläschen entzogen und in den Körper aufgenommen. Als Transportmedium dient das Blut. Der Sauerstoff bindet dabei an die Häm-Gruppe des Hämoglobins und wird damit im Blut gelöst. Jetzt kann über den Blutkreislauf jede Zelle des Körpers mit dem Sauerstoff erreicht werden.

Für die Energiegewinnungsprozesse der Zellen dient das O_2 als Oxidationsmittel. Ein Hauptprodukt der Zellatmung ist das Kohlenstoffdioxid. Für den Körper hat es keinen weiteren Nutzen und wird als Abfallprodukt wieder ausgeschieden. Um erneut zu den Lungen zu gelangen, wo es als Gas ausgeatmet wird, muss es abermals über das Blut transportiert werden. Aufgrund der neuen Molekülstruktur und veränderter chemischer Eigenschaften kann es nicht an der Häm-Gruppe des Hämoglobins binden.

Da das Blut zu einem großen Anteil aus Wasser besteht, kann ein Teil des Kohlenstoffdioxids aufgrund seiner Polarität direkt in Lösung gehen. Dennoch lässt sich das $CO_{2(g)}$ in einem wässrigen Medium besser in Form seines Hydrates ($HCO_{3(aq)}^- + H_{(aq)}^+$) transportieren. Kohlenstoffdioxid reagiert dabei mit einem Wassermolekül zur Kohlensäure. In Anwesenheit weiterer Wassermoleküle, zerfällt diese jedoch sofort zu einem Proton und einem Hydrogencarbonat-Ion. In wässriger Lösung ist das Kohlensäure-Molekül nur zu 0,2 % enthalten.



Das Kohlenstoffdioxid-Kohlensäure-Gleichgewicht (I) liegt unter Normalbedingungen zu 99 % auf der Linken Seite. Zudem läuft die Kohlensäurebildung nur sehr langsam ab. Um also das im Körper gebildete $CO_{2(g)}$ effizient im Blut zu lösen und damit den Abtransport dieses Abfallproduktes zu gewährleisten, bedarf es eines Katalysators.

Diese Aufgabe wird von einem Enzym, der Carboanhydrase, übernommen. Es ist hauptsächlich in den Erythrocyten, den roten Blutkörperchen, enthalten und ist einer der effizientesten, bekannten Biokatalysatoren. Die Katalysegeschwindigkeit ist mit 36 Millionen Umsetzungen

pro Enzym-Molekül und Minute enorm hoch. Um es zu isolieren, werden die Erythrocyten in der Zentrifuge vom Blutplasma getrennt und mit einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen. Dabei können sämtliche wasserlöslichen Bestandteile des Blutes ausgewaschen werden.

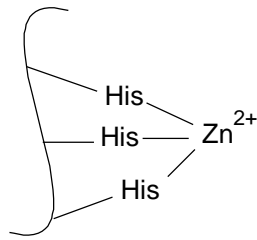
Nach erneutem Zentrifugieren wird ein Wasser-Ethanol-Gemisch sowie Trichlormethan zu den Erythrocyten gegeben. Durch das Konzentrationsgefälle an Salzen und anderen wasserlöslichen Stoffen zwischen dem Inneren der Erythrocyten und der äußeren Lösung, baut sich ein osmotischer Druck auf. Die gelösten Stoffe im Inneren der roten Blutkörperchen sind nicht in der Lage die semipermeable Biomembran nach außen zu durchdringen. Dagegen ist diese Membran wasserdurchlässig, so dass Wassermoleküle, in dem Bestreben einen Konzentrationsausgleich herbeizuführen, ins Innere der Zelle eindringen können. Gleichzeitig sind das Ethanol und das Trichlormethan durch ihren unpolaren, lipophilen Charakter dazu in der Lage die Biomembran zu lösen und stückweise abzutragen. Es kommt zum Platzen der Zellen, so dass der Zellsaft, der auch die Carboanhydrase enthält mit der Wasser-Methanol-Trichlormethan-Lösung vereinigt wird. Die unerwünschten Zellbestandteile können nun mittels Zentrifuge vom flüssigen Überstand getrennt werden. Das Enzym ist dann in diesem Überstand halten.

Die Lage des Gleichgewichtes in (I) wird über den pH-Wert gesteuert. Liegt der pH-Wert im basischen Bereich, so wird das Gleichgewicht zu Gunsten der Kohlensäurebildung verschoben. Im leicht sauren Milieu dagegen wird die Bildung von Kohlenstoffdioxid und Wasser begünstigt. Menschliches Blut hat einen pH-Wert im Bereich von $\text{pH} = 7,3$ bis $\text{pH} = 7,5$.

Werden Natriumhydrogencarbonat und Dinatriumhydrogenphosphat in Wasser gelöst, so entsteht eine basische Pufferlösung. Neben den Eigenschaften als Säure-Base-Puffer wirkt das Hydrogenphosphat als Stabilisator für das Enzym.

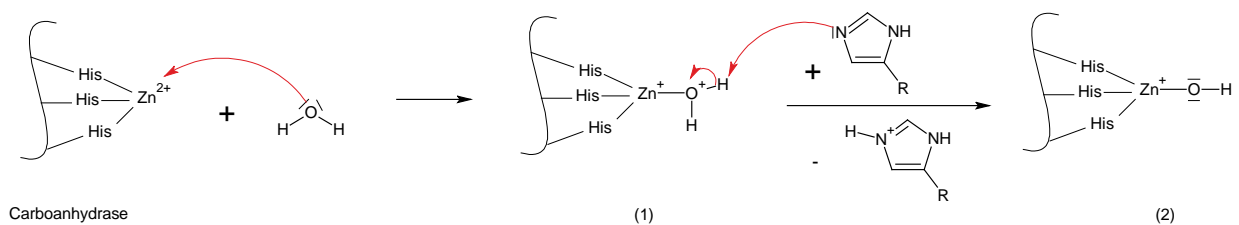
Wird nun der Indikator Phenolrot zugesetzt, so zeigt er den basischen Charakter der Lösung durch eine rot-violett Färbung (für pH-Werte $> 7,3$) an. Bei Zugabe des Enzyms Carboanhydrase zu dieser Pufferlösung und anschließendem Zutropfen des „kohlenensäurehaltigen“ Mineralwassers, katalysiert das Enzym die Bildung des Kohlenstoffdioxid-Hydrates. Da die Lösung alkalisch ist, werden die Kohlenstoffdioxid-Moleküle, die in großer Menge im Mineralwasser gelöst sind, schnell umgesetzt.

Um den Mechanismus dieser Umsetzung verstehen zu können ist es hilfreich ein stark vereinfachtes Modell der Carboanhydrase zu betrachten. Das aktive Zentrum des Enzyms bildet ein Zn(II) -Kation, das über drei Histidin-Reste fixiert ist.

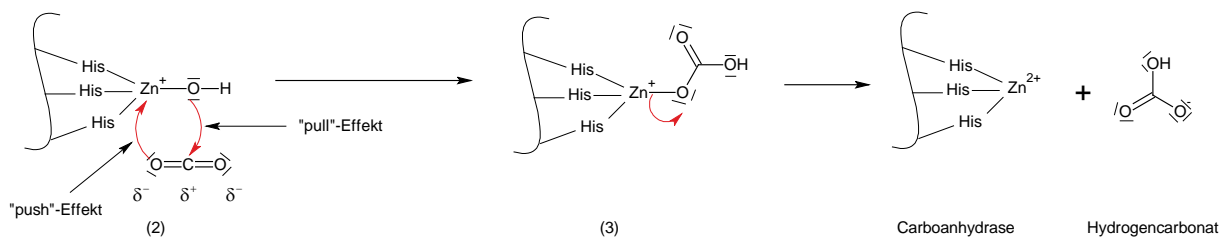


Carboanhydrase

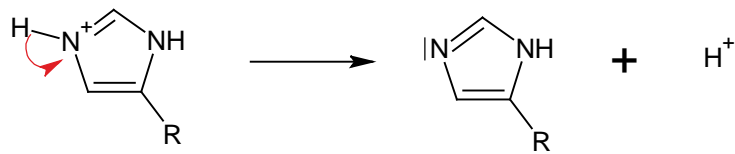
Durch den stark nucleophilen Charakter des $Zn(II)$ -Kations bindet an die vierte Koordinationsstelle des Zinks ein Wassermolekül mit einem freien Elektronenpaar des Sauerstoffatoms. Um die positive Ladung am O-Atom des Zwischenprodukts (1) zu stabilisieren, wird nun eines der Protonen abgespalten. Das Enzym enthält in seiner Aminosäurekette basische Histidin-Reste. Dieser Histidin-Rest ist unter Anderem aus einem aromatischen 5-Ring aufgebaut. Das freie Elektronenpaar des unbesetzten N-Atoms fängt das freigesetzte Proton sofort ab und bildet ein weiteres Zwischenprodukt (2).



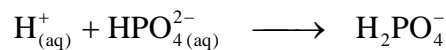
Dieses Zwischenprodukt ist auf zweifache Weise Aktiviert und reagiert rasch mit einem CO_2 -Molekül zu einem komplexierten Hydrogencarbonat-Molekül weiter. Einerseits agiert das Zinkkation als Lewis-Säure und zieht am freien Elektronenpaar des O-Atoms eines CO_2 -Moleküls. Andererseits wirkt der koordinierte Hydroxid-Rest mit einem seiner freien Elektronenpaare als Lewis-Base und drückt ein Elektronenpaar an das partial positiv geladene C-Atom des Kohlenstoffdioxids. Durch den elektronenziehenden und -schiebenden Effekt wird dieser Mechanismus auch als „push-pull-Mechanismus“ bezeichnet. Die zweifache Aktivierung des Enzymzentrums erklärt die hohe Reaktionsgeschwindigkeit dieses Katalysators. Schließlich tritt das vorgebildete Hydrogencarbonat-Molekül aus dem Komplex aus, so dass die Carboanhydrase wieder regeneriert wird.



Das vom Histidin-Rest abgefangene Proton wird nach kurzer Zeit ebenfalls wieder abgespalten.



Zunächst werden die so gebildeten Protonen durch die HPO_4^{2-} -Ionen der Pufferlösung abgefangen.



Ist das Hydrogenphosphat auf diese Weise vollständig zu Dihydrogenphosphat umgesetzt, so können die Protonen nicht weiter abgefangen werden. Die Lösung wird allmählich saurer, so dass der Indikator Phenolrot das Gemisch gelb ($1 < \text{pH-Wert} < 7,3$) färbt. Es wird so lange Kohlensäure gebildet, bis sich ein neues Gleichgewicht (I) eingestellt hat.

Wird dieses Experiment ohne die Carboanhydrase durchgeführt, so dauert es sehr viel länger, bis sich das Gleichgewicht (I) zu Gunsten der Kohlensäurebildung verschoben hat. Dennoch wird die Lösung auch ohne den Katalysator allmählich saurer. Hierbei sorgt das Prinzip von Le Chatelier für eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Produktseite. Durch die hohe Konzentration an gelöstem CO_2 im Mineralwasser wird das Gleichgewicht auf die Produktseite gedrückt. Analog zur oben beschriebenen Reaktion wird auch diese Lösung langsam gelb gefärbt. Allerdings dauert die Reaktion sehr viel länger. Der langsame Reaktionsverlauf sorgt auch dafür, dass es innerhalb des Reaktionsgemisches zu unterschiedlichen pH-Werten kommt. So färbt sich zuerst der obere Bereich der Lösung gelb, da hier als erstes das kohlenstoffdioxidhaltige Wasser vorhanden ist und die Bildung von Kohlensäure bereits stattfindet. Gleichzeitig ist der untere Bereich der Lösung nach wie vor alkalisch und damit violett gefärbt. Nur langsam durchmischt sich die Lösung, so dass der untere Bereich vergleichsweise spät gelb gefärbt wird.

Methodisch-didaktische Analyse:

1. Einordnung

Der Versuch kann wie folgt in die Themengebiete des hessischen Lehrplans (G8) eingebettet werden.

Jahrgangsstufe u. Unterrichtseinheit	Themengebiet
9G.2	<u>Eigenschaften von Säuren</u> : Saure Lösungen (verdünnte Säuren) in Haushalt und Industrie vergleichen; Gefahren im Umgang mit Säuren darstellen; Beispiele: Salzsäure (Schweflige Säure; Schwefelsäure, Kohlensäure).
11G.2	<u>Aminosäuren, Peptide, Polypeptide</u> : Struktur und Eigenschaften natürlicher Aminosäuren; Peptidbindung; Strukturen und Strukturaufklärung von Eiweißen; Vorkommen und Bedeutung; Nachweisreaktionen für Aminosäuren und Eiweiße.
11G.2	<i>Fakultativ</i> : <u>Enzyme</u> : Aufbau und Bedeutung in Stoffwechselprozessen (Modellvorstellung der Enzymkatalyse).
12G.1	<u>Geschwindigkeit chemischer Reaktionen</u> : Reaktionszeit; Reaktionsgeschwindigkeit (Definition und experimentelle Ermittlung; c / t – Diagramme); Anwendung analytischer Verfahren zur Messung der Änderung des Reaktionsverlaufs (z.B. Fotometrie, Maßanalyse, Leitfähigkeitsmessungen); Einfluss verschiedener Faktoren (z.B. Stoff, Konzentration, Temperatur, Zerteilungsgrad, Druck); Aktivierungsenergie und Katalyse/ Katalysatoren.
12G.1	<i>Fakultativ</i> : <u>Enzymkinetik</u> : Bedeutung im Stoffwechsel.

2. Aufwand

Mit Ausnahme einer Zentrifuge und dazugehörigen Zentrifugengläschen zählen alle verwendeten Geräte zur Standardausrüstung einer Chemiesammlung. Diese ist jedoch wichtig für das Gelingen dieses Versuches. Ohne die Verwendung einer Zentrifuge können die Erythrocyten nicht ohne weiteres aus dem Blut abgetrennt werden. Der Versuch kann damit nicht ohne die Verwendung einer Zentrifuge durchgeführt werden. Zudem kann sich die Beschaffung von frischem Schweine- bzw. Rinderblut schwierig gestalten, da es wenig Betriebe gibt, in denen noch selbst geschlachtet wird. Die Möglichkeiten der Beschaffung frischen Schweine- bzw. Rinderblutes sind damit ortsabhängig. Alle verwendeten Chemikalien werden nur in kleinen Mengen benötigt und verursachen damit keine hohen Kosten. Durch das Ansetzen zahlreicher Lösungen ist der Versuch sehr zeitintensiv in der Vorbereitung. Auch das Isolieren der Carboanhydrase ist zeitaufwendig. Der gesamte Versuch kann nicht innerhalb einer Doppelstunde durchgeführt werden. Die Isolation des Enzyms und der Enzymtest sind innerhalb einer Doppelstunde durchführbar. Die Nachbereitung erfordert ebenfalls viel Zeit, da die

Erythrocyten im Zentrifugenglas verklumpen und fest in diesem kleben. Die Reinigung der verwendeten Zentrifugengläser ist sehr aufwendig.

Insgesamt ist der Versuch nur bedingt für den Einsatz in der Schule geeignet. Sollte eine Zentrifuge an der Schule vorhanden sein, so eignen sich bei guter Vorbereitung die Isolation des Enzyms und die Durchführung des Enzymtests für den Unterricht. Alle anderen Arbeiten sollten außerhalb des Unterrichts geschehen und nehmen viel Zeit in Anspruch.

3. Durchführung

Die gewünschten Effekte sind gut aus der Nähe erkennbar. Die Schüler sollten unbedingt im Bereich des Versuchsgeschehens stehen, um zum einen das Verklumpen der Erythrocyten und zum anderen die Farbumschläge der Versuchslösungen gut beobachten zu können. Alle verwendeten Chemikalien mit Ausnahme des Chloroforms sind nach HessGiss für Schülerexperimente ab der Sekundarstufe I freigegeben. Die Verwendung von Chloroform in Schülerversuchen ist nicht erlaubt. Eine Ersatzstoffprüfung für diesen Stoff ist besonders wichtig. Damit darf dieses Experiment nicht als Schülerversuch durchgeführt werden.

Literatur:

- Versuchsvorschrift aus: **Naturwissenschaften im Unterricht**, 2/06, Heft 92, S. 30.
- K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, **Organische Chemie, Dritte Auflage**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000.
- A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, **Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 102. Auflage**, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 2007.
- Charles E. Mortimer, Ulrich Müller, **Chemie, das Basiswissen der Chemie**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.
- Kaim, W.; Schwederski, B., **Bioanorganische Chemie – Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen**, Teubner Studienbücher Chemie, 1995.
- **HessGiss-Datenbank**, V 11.0 – 2006/2007.
- www.dguv.de, **GESTIS-Stoffdatenbank**, 2009, Zugriff: 02.07.09.
- **Lehrplan Chemie, Gymnasialer Bildungsgang, Jahrgangsstufen 7G bis 12G**, Hessisches Kultusministerium 2008.