



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



BIOCHEMIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Ćwiczenie 7

Ślina

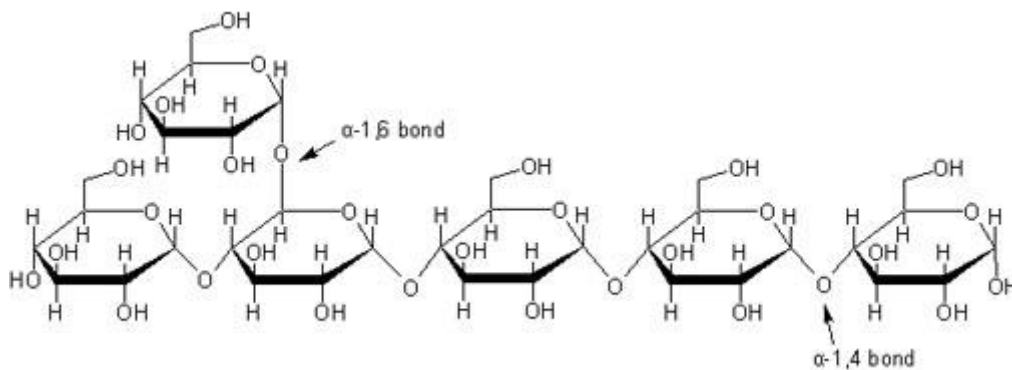
Wprowadzenie

Ślina jest naturalnym środowiskiem dla zębów, przyzębia i błony śluzowej. Jej wydzielanie odgrywa ważną rolę w zapewnieniu prawidłowej przemiany i wchłaniania produktów pokarmowych, podtrzymywaniu homeostazy, realizacji funkcji wydzielniczej oraz obronnej. Ślina jest wydzieliną trawienną, wytwarzaną przez 3 pary głównych gruczołów ślinowych oraz liczne, mniejsze gruczoły, rozsiane w błonie śluzowej jamy ustnej.

Poza wodą stanowiącą ok. 99% w ślinie występują liczne składniki mineralne i organiczne. W ślinie występują następujące jony: Na^+ , K^+ , Cl^- , I^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} a także w znacznie mniejszych ilościach jony rodankowe (SCN^-), będące produktem detoksykacji pobieranego z pokarmem CN^- (wyższy poziom jonów rodankowych występuje w ślinie palaczy, u których jony te powstają w wyniku procesu metabolizmu cyjanowodoru wchodzącego w skład dymu tytoniowego). Spośród związków organicznych ślina zawiera: białka pochodzące z osocza (albumina, ceruloplazmina, gamma-globuliny) i białka wytwarzane w śliniankach (mucyna), w tym enzymy (amylaza, peptydazy, peroksydazy, transaminazy, lizozym, laktoferyna, anhydraza węglanowa).

α -amylaza jest wszechobecna w środowisku jamy ustnej. Występuje w postaci izoenzymu alfa-s produkowanego przez gruczoły ślinowe w płynie dziąsłowym i naddziąsłowej płytce nazębnej, w odróżnieniu od alfa-p, produkowanego przez trzustkę. Oba izoenzymy mają identyczną specyficzność substratową, wytwarzając te same produkty. α -Amylaza hydrolizuje α -1,4 glukany (skrobia, glikogen) i w wyniku przemian powstaje dwucukier – maltoza. Następnie disacharydazy rozkładają maltozę do glukozy. Jego rola polega na trawieniu trafiających tam węglowodanów. Rozcina on wiązanie 1,4-alfa-glikozydowe. Nie powstają jednak zwykle na tym etapie same oddzielne cząsteczki glukozy, trawienie to jest dopiero wstępne, kontynuowane zaś będzie w dalszej części przewodu pokarmowego.

Enzym ten jest aktywny przy pH 4-11 przy optimum wynoszącym ok. 6,6. Zachowuje działanie wyłącznie w obecności jonów chlorkowych. Łącznie amylaza ślinowa trawi około 30% skrobi, co wykazano badając pacjentów z niewydolnością trzustki. Największą aktywnością amylaza wykazuje się w temperaturze 40°C . Najniższą zaś w temperaturze 0°C . Po przekroczeniu 45°C następuje denaturacja enzymu (informacje na temat amylazy ślinowej można znaleźć również we wstępie teoretycznym do Ćwiczeń nr 8 i 9).



Rys. 1 Schemat budowy skrobi. Amylaza katalizuje hydrolizę wewnętrzną wiązań α -(1-4) glikozydowych



Rys. 2 Trawienie skrobi

Uwolnione w tych przemianach monocukry są metabolizowane przez drobnoustroje do kwasów (m.in. mlekowego) lub powstają z nich bakteryjne polisacharydy. Cukry zarówno pochodzenia pokarmowego, jak i ślinowego uczestniczą w powstawaniu w jamie ustnej środowiska sprzyjającego rozwojowi próchnicy. W ochronnej funkcji śliny znaczną rolę spełniają zawarte w niej białka przeciwbakteryjne: lizozym, laktoferyna, laktoperoksydaza oraz immunoglobuliny.

Lizozym działa jako czynnik bakteriolityczny, uszkodzając mucynową ścianę komórkową. Laktoferyna wiąże atomy żelaza, hamując tym samym rozwój bakterii, do metabolizmu których ten pierwiastek jest niezbędny. Sjaloperoksydaza jest ważnym enzymem przeciwbakteryjnym, który w połączeniu z nadtlakiem wodoru może oddziaływać na pałeczki kwasu mlekowego i paciorkowce wywołujące próchnicę. Silne działanie antybakteryjne wywierają także zawarte w ślinie immunoglobuliny, głównie IgA, a także IgM i IgG.

Wydzielanie śliny odbywa się bez przerwy. Jest wynikiem pobudzenia autonomicznego układu nerwowego. Podstawowe wydzielanie śliny wynosi średnio 0,33–0,5 mL/min, zaś po silnym pobudzeniu pokarmem może wzrosnąć do 1,5–2,3 mL/min. Po sztucznej stymulacji (np.

pilokarpiną) może wzrosnąć nawet do 5,0 mL/min. Dobowa objętość wydzielanej śliny wynosi 1–2 L.

Ślina zapewnia utrzymanie optymalnego pH, a poprzez swoje układy buforowe przeciwdziała zakwaszeniu środowiska, co chroni zęby między innymi przed demineralizacją szkliwa. Odczyn pH śliny uwarunkowany jest zawartością elektrolitów i układów buforowych, tj. wodorowęglanów, fosforanów i białek. Ślina ma także zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej, oznacza się w niej stężenia niektórych leków (fenytoina), a także hormonów (kortyzol, progesteron, estriol, testosteron). Ostatnio zalecane jest oznaczanie estriolu w ślinie jako fizjologicznego markera początku porodu, ponieważ jest on odpowiedzialny za przygotowanie macicy do porodu i bezpośrednio sygnalizuje jego wystąpienie. Na 3 tygodnie przed porodem stwierdza się znaczący wzrost stężenia estriolu w ślinie.

Mucyny są jednymi z ważniejszych białek jamy ustnej. W niestymulowanej ślinie stanowią aż 20–30% całkowitej ilości białek. Należą one do grupy glikoprotein. Ich charakterystyczną cechą jest duża zawartość wodorowęglanowych łańcuchów, które połączone są z polipeptydowym szkieletem wiązaniami kowalencyjnymi. Mucyny ślinowe stanowią znaczący czynnik w utrzymaniu prawidłowego stanu jamy ustnej. Do ważniejszych zadań, jakie pełnią w jej obrębie, należą: formowanie błonki nabytej powlekającej tkanki twarde i miękkie jamy ustnej, a także uzupełnienia z tytanu, ochrona przed ubytkami nie próchnicowego pochodzenia, ochrona przed próchnicą, tworzenie kompleksów heterogenicznych oraz udział w nieswoistej obronie organizmu.

Część doświadczalna

Ćwiczenie 7. Ślina

Doświadczenie 1. Określenie optymalnego pH dla aktywności amylazy ślinowej

Wyjaśnienie:

Wśród czynników wpływających na szybkość reakcji enzymatycznych wymienić należy: stężenie substratu, stężenie enzymu, temperaturę, pH środowiska, obecność aktywatorów oraz obecność inhibitorów.

Wpływ pH. Szybkość reakcji katalizowanej przez enzym jest maksymalna przy określonej wartości pH, a maleje w miarę oddalania się od niej (zbyt kwasowe lub zasadowe środowisko może powodować denaturację białka). Zmiany aktywności enzymatycznej przy różnym pH są wywoływane zmianami w stopniu zjonizowania składników układu: enzymu, substratu i kompleksu enzym-substrat. Optymalne pH do działania niektórych enzymów zależy z tego powodu i od rodzaju substratu. Grupy czynne centrum aktywnego enzymu tylko w jednej z jonowych form wykazują właściwości katalityczne; podobnie w większości wypadków tylko jedna z możliwych form grup jonizujących substratu jest rzeczywiście aktywna w reakcji enzymatycznej. W tworzeniu kompleksu enzym-substrat duże znaczenie ma ładunek substratu i enzymu, ponieważ siły wiążące te dwa związki mogą mieć charakter elektrostatyczny.

Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na przeprowadzeniu reakcji stopniowego rozkładu skrobi przez amylazę ślinową i wyznaczeniu warunków pH, w których amylaza wykazuje największą aktywność wobec skrobi jako substratu.

Przygotowuje się 3 szeregi probówek (po 10 szt.), do których wprowadza się po 5 kropli płynu Lugola. W krótkich odstępach czasu (co 3 minuty) do probówek wprowadza się pipetą próbki hydrolizatu (mieszanina kleiku skrobiowego, roztworu śliny i buforu o określonym pH). Pomiedzy pobieraniem prób hydrolizat powinien być inkubowany w temperaturze 37°C.

Należy obserwować przebieg reakcji barwnej z jodem i zanotować spostrzeżenia.

Skrobia stopniowo ulega hydrolizie przez produkty pośrednie, którymi są amylo-, erytro-, achro- i maltodekstryny a produktem końcowym jest mieszanina dekstryn, maltozy i glukozy. Zanik zabarwienia z roztworem I w KI nosi nazwę punktu achromowego.

Sprzęt: 4 probówki falcone 50 cm³, 3 x 10 probówek szklanych, 3 statywy na probówki, 4 pipetki plastikowe, łaźnia wodna, stoper

Przygotowanie roztworu śliny:

Usta przepłukać wodą destylowaną. Następnie pobrać 25 cm³ wody destylowanej do ust, poczekać ok. 1 minuty i zebrać ślinę do probówki typu Falcone 50.

Odczynniki: roztwór śliny, 1% roztwór skrobi, płyn Lugola, bufor cytrynianowo - fosforanowy o pH 5.0, 6.0 i 7.0

Wykonanie:

1. Przygotować cztery probówki typu Falcone (obj. 50 cm³). Do pierwszej z nich wprowadzić 35 cm³ 1% roztworu skrobi.
2. Do trzech kolejnych probówek typu Falcone wprowadzić po 2 cm³ roztworu śliny i po 8 cm³ buforów o następujących wartościach pH:
probówka **nr 1** – bufor o **pH=5**,
probówka **nr 2** – bufor o **pH=6**
probówka **nr 3** – bufor o **pH=7**, czyli **do każdej z probówek wprowadzamy tylko jeden bufor!**
3. Wszystkie **4 falkony** inkubować w łaźni wodnej w temperaturze **37°C** przez **5 minut**.
4. W trakcie inkubacji falkonów, należy przygotować **3 zestawy po 10 szt. probówek** (każdy zestaw umieścić w osobnym statywie).
5. Do wszystkich probówek znajdujących się w statywach wprowadzić **po 5 kropli płynu Lugola**.
6. **Po zakończeniu 5-minutowej inkubacji** w łaźni wodnej (**ciąg dalszy punktu nr 3**) do falconów zawierających mieszaninę roztworu śliny i buforów o trzech różnych wartościach pH dodać po 10 cm³ roztworu skrobi z pierwszego falconu (skrobię należy odmierzyć pipetą lub cylindrem miarowym!).
7. Natychmiast po dodaniu skrobi pobrać po 1 cm³ mieszaniny z każdego z trzech falconów (z mieszaninami o różnym pH). Pobrane próbki 1 cm³ dodać do pierwszych probówek w każdym zestawie (pkt 4) zawierających płyn Lugola. Hydrolizaty w falconach ponownie umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 37°C.

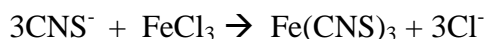
8. Włączyć stoper. Pobierać co 3 minuty kolejno po 1 cm³ hydrolizatu z mieszanin o różnym pH i dodawać je do kolejnych probówek z jodem. Po pobraniu kolejnej próbki hydrolizaty ponownie należy umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 37°C w celu dalszej inkubacji.

9. W przypadku braku widocznej zmiany lub zbyt szybkiej zmiany barwy we wszystkich trzech szeregach probówek skorygować odstęp czasu, w którym pobierany jest hydrolizat.

Doświadczenie 2. Wykrywanie jonów rodankowych

Zasada:

Jony rodankowe (tiocyaninowe) w obecności jonów Fe³⁺ tworzą czerwony rodanek żelazowy. Przy większym stężeniu jonów rodankowych tworzy się związek kompleksowy tej samej barwy.



Wykonanie:

1. Przygotować trzy probówki. Do jednej z nich nalać 2 ml wody, do drugiej 2 ml roztworu śliny osoby niepalącej, do trzeciej 2 ml śliny osoby palącej papierosy.
2. Do wszystkich trzech probówek dodać po 3 krople rozcieńczonego kwasu solnego i po 5 kropli 5% roztworu chlorku żelazowego.
3. Porównać zawartość rodanków w ślinie u palaczy papierosów i osób niepalących (wyjaśnienie istniejących różnic można znaleźć w części teoretycznej Ćwiczenia).

Schemat doświadczenia:

Odczynnik	Probówka I	Probówka II	Probówka III
1. Woda	2 ml	-	-
2. Roztwór śliny	-	2 ml	2 ml
3. Rozc. kwas solny	3 krople	3 krople	3 krople
4. 5% r-r chlorku żelazowego	5 kropli	5 kropli	5 kropli

Doświadczenie 3. Wytrącanie mucyny

Zasada:

Mucyna wtrąca się ze śliny rozcieńczonym roztworem kwasu octowego, etanolem lub przez nasycenie roztworu śliny siarczanem amonowym.

Wykonanie:

Do 5 ml roztworu śliny dodawać 0,1M roztworu kwasu octowego, aż do wytrącenia się kłaczkowatego osadu.

Doświadczenie 4. Wykrywanie białka w ślinie

Zasada:

Rakcja biuretowa jest charakterystyczna dla wiązań peptydowych, przy czym dają ją związki posiadające w cząsteczce co najmniej dwa takie wiązania. Nazwa metody pochodzi od biuretu (dimocznika), najprostszego związku spełniającego ten warunek. W środowisku zasadowym wiązanie peptydowe ulega tautomeryzacji i występuje w formie enolowej.

Jony miedzi (Cu^{2+}) ulegają skompleksowaniu przez enolowe formy wiązań peptydowych, a w kompleksach takich jony miedzi tworzą dwa wiązania z atomami tlenu oraz cztery wiązania koordynujące z atomami azotu. Kompleks ma barwę fioletową.

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki. Do pierwszej z nich wprowadzić 1 ml wody destylowanej a do drugiej 1 ml roztworu śliny. Następnie do obydwu probówek dodać po 0,5 ml 10% roztworu NaOH i po 5 kropli 1% roztworu CuSO_4 .

Schemat doświadczenia:

Odczynnik	Probówka I	Probówka II
1. Woda	1 ml	-
2. Roztwór śliny	-	1 ml
3. 10% r-r NaOH	0,5 ml	0,5 ml
4. 1% r-r CuSO_4	5 kropli	5 kropli

Literatura:

- 1) Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
- 2) Materiały do ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (www.chem.uw.edu.pl/people/AMyslinski/.../Pracownie/.../PBioch.doc)
- 3) Moss S.: Rola śliny w utrzymaniu zdrowia jamy ustnej. Stom. Współcz. 1994, 2, 154–158.
- 4) Wincewicz-Pietrzykowska A., Farbiszewski R.: Ślina – rola biologiczna, skład i mechanizm wydzielania. Funkcja i wydzielanie śliny. Czas. Stomatol. 1984, 37, 411–415.