



УДК 577.156.02

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ
ФЕРМЕНТАМИ*Беликов В. М., Антонова Т. В., Квасов Б. А.**Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

Изучена кинетика накопления аминокислот при последовательном действии на казеин пепсина и панкреатина. Процесс имеет колебательный характер. Монотонные кривые описываются уравнением для случая сильного ингибирования реакции ее продуктами. Определены кинетические параметры. При добавлении меченых аминокислот отмечено их включение в полипептидную фракцию. Полученные данные позволяют вычислить глубину гидролиза в отсутствие продуктов и, следовательно, создать модель для определения перевариваемости пищевых белков.

Ферментативный гидролиз белков является существенной частью пищеварительного процесса, а также основой процессов автолиза и ферментации, применяемых для получения вкусовых и питательных добавок к пищевым продуктам. В связи с этим большой интерес вызывает разработка методов оценки белков и ферментных систем с точки зрения соответствия атакуемости и активности. Изучение атакуемости *in vitro* не дает полного представления о процессе, поскольку в желудочно-кишечном тракте в результате трехстадийного процесса переваривания (пепсином, панкреатином и аминоксиптидазой) происходит полный гидролиз белков до аминокислот. В модельных же системах глубина их превращения значительно меньше.

В ходе изучения переваривания белков *in vitro* [1—5] возникло предположение об ингибировании ферментативного гидролиза продуктами реакции — пептидами и аминокислотами. Для удаления их в ходе реакции предложено использовать полупроницаемую мембрану [6] и ультрафильтрацию [7]. Тем не менее полный гидролиз белков не достигается даже в этих условиях. Использование трехстадийной модели в периодическом режиме также не обеспечивает глубину гидролиза выше 70% [8].

Ввиду принципиального различия условий переваривания *in vivo* и *in vitro* мы предположили, что адекватная характеристика субстрата и ферментной системы может быть получена *in vitro* на основании изучения кинетических параметров процесса при концентрациях белка, близких к тем, которые имеют место в желудочно-кишечном тракте.

Для этого ранее мы исследовали кинетику гидролиза различных белков пепсином. Оказалось, что зависимость содержания аминокислот в пепсиновом гидролизате от времени имеет сложный, немонотонный характер [9]. Аналогичный результат был получен и для второй стадии переваривания белков — гидролиза пепсинового гидролизата панкреатином (рис. 1). Немонотонный характер кривых наблюдается как для нативного панкреати-

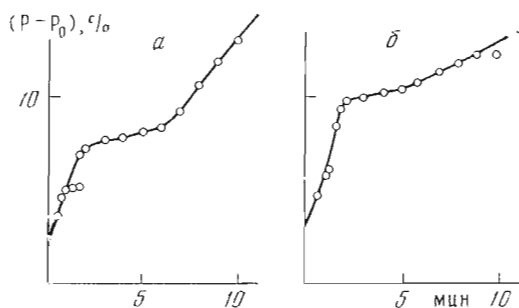


Рис. 1. Зависимость глубины гидролиза ПГК свободным (а) и иммобилизованным (б) панкреатином для малого времени превращения

на, так и для панкреатина, иммобилизованного на сополимере стирола и малеиновой кислоты в присутствии солей кобальта и хрома.

Иммобилизация панкреатина существенно не влияет на степень превращения им пепсинового гидролизата казеина (ПГК) (рис. 1б), однако использование проточной системы с иммобилизованным ферментом позволяет провести реакцию на большую глубину. Так, пропусканием раствора ПГК через колонку, наполненную иммобилизованным панкреатином, при времени контакта 15 мин удается достичь 70—75 %-ного гидролиза.

Если в первом приближении рассматривать получаемые кинетические кривые как монотонные, можно попытаться применить к ним уравнение интегральной кривой для случая ингибирования продуктом реакции [10]:

$$p = \frac{Vt}{1 - K_m/K_p} - \frac{K_m(1 + s_0/K_p)}{1 - K_m/K_p} \ln \frac{s_0}{s_0 - p}. \quad (1)$$

Однако в изучаемом случае молярная концентрация продукта реакции заведомо больше молярной концентрации субстрата, т. е. $p > s_0$. Выражение под логарифмом, следовательно, приобретает отрицательный знак, и уравнение не имеет решения. Поэтому интегральные кривые мы линеаризовали в координатах:

$$\frac{t}{\ln \frac{c_\infty - c_0}{c_\infty - c_t}} \text{ от } \frac{c_t - c_0}{\ln \frac{c_\infty - c_0}{c_\infty - c_t}},$$

где $c_\infty - c_0$ соответствует s_0 . Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, и наклон прямой в соответствии с уравнением

$$c_t - c_0 = V^*t - K^* \ln \frac{c_\infty - c_0}{c_\infty - c_t}, \quad (2)$$

где

$$V^* = V/(1 - K_m/K_p), \quad \text{а } K^* = K_m \left(1 + \frac{c_\infty - c_0}{K_p} \right) / (1 - K_m/K_p),$$

дают возможность определить величины V^* и K^* . При этом возникает затруднение в определении c_∞ , так как за время, приемлемое для измерений, реакция до конца не доходит. Поэтому за c_∞ принимали содержание аминокислот при теоретически полном гидролизе навески белка. Расчет показывает, что любое другое значение c_∞ не изменяет качественных выводов, хотя, естественно, и изменяет числовые значения коэффициентов. Мы нашли более удобным определять c_0 путем экстраполяции начального участка кривой к нулевому времени, что осуществлялось одновременно с определением v .

Таблица 1

Коэффициенты уравнения (2) для гидролиза казеина пепсином
Время опыта 1 ч *

$(c_{\infty} - c_0)$, М	$-V \cdot 10^{-5}$, М·мин ⁻¹	$-K$ *, М
0,14	2,19	0,146
0,093	4,16	0,108
0,07	1,19	0,074
0,035	2,05	0,042
0,018	1,39	0,021
	Ср. 2,2±0,5	

* Отдельные значения V * и K * определяются с относительной ошибкой 15—25 и 1,5% соответственно.

Таблица 2

Коэффициенты уравнения (2) для гидролиза ПГК панкреатином
Время опыта 1 ч *

$(c_{\infty} - c_0) \cdot 10^2$, М	$-V \cdot 10^6$, М·мин ⁻¹	$-K \cdot 10^2$, М
6,0	23,1	7,14
6,0	15,3	6,66
6,0	7,4	6,41
5,7	7,8	5,9
	Ср. 13,4±3,7	Ср. 6,53±0,26
1,35	3,6	1,41
1,33	3,4	1,47
1,35	1,8	1,35
1,30	4,1	1,46
	Ср. 3,2±0,5	Ср. 1,42±0,03
0,57	3,46	0,62
0,57	1,28	0,58
0,63	3,12	0,62
0,60	2,64	0,60
	Ср. 2,6±0,5	Ср. 0,61±0,01

* Отдельные значения V * и K * определяются с относительной ошибкой 1,5—25 и 1,5% соответственно.

Значения V * и K * для стадии гидролиза казеина пепсином и для стадии гидролиза ПГК свободным панкреатином, полученные таким образом, приведены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1 и 2, все значения V * и K * отрицательны, что указывает на существенно более сильное связывание активными центрами продуктов реакции, чем субстрата.

Поскольку $K_m/K_p \gg 1$, уравнение (2) можно привести к более удобному виду, так как отношение K_m/V определяется точнее, чем V и K_m

$$t = \frac{K_m}{V} \left[\left(1 + \frac{c_{\infty} - c_0}{K_p} \right) \ln \frac{c_{\infty} - c_0}{c_t - c_0} - \frac{c_t - c_0}{K_p} \right]. \quad (3)$$

Для определения параметров, входящих в уравнение (3), мы измерили начальные скорости реакций при различных концентрациях субстрата. В координатах Лайнуивера — Берка прямая пересекает оси очень близко от нулевой точки, поэтому V и K_m определяются с большой ошибкой. Полученные значения приведены в табл. 3.

Кинетические параметры гидролиза казеина протеолитическими ферментами

Субстрат	[Фермент], г/л	$V \cdot 10^4$, М·мин ⁻¹	$K_m \cdot 10^3$, М	$V/K_m \cdot 10^3$, мин ⁻¹	$K_p \cdot 10^{-4}$, М	K_m/K_p
Казеин ПГК	Пепсин	3,2±2,6	8,8±7,5	3,7±1,1	3(60)	300(15)
	Панкреатин	1,02±0,35	1,32±0,5	7,7±2,0	3,9(8)	34(16)

Таблица 4

Гидролиз различных белков, катализируемый пепсином

Субстрат *	$-V^*$, мин ⁻¹	V^*/K^* , отн. ед.
Казеин	0,3	290
Альбумин	0,022	47
Желатин	0,00055	1

* Концентрация субстратов 10 г/л, пепсина — 1 г/л.

Для определения K_p отмечали время достижения выбранной глубины гидролиза (α) при различных исходных концентрациях субстрата. Разлагая экспоненту в ряд, получаем из уравнения (2) выражение (4), связывающее α и t_α :

$$(c_\infty - c_0) \frac{\alpha^2}{2} = K_p \frac{V}{K_m} t_\alpha - K_p \left(\alpha + \frac{\alpha^2}{2} \right), \quad (4)$$

где $\alpha = (c_\alpha - c_0)/(c_\infty - c_0)$; t_α — время достижения c_α . Получены значения K_p $6 \cdot 10^{-3}$ М для пепсина и $8,0 \cdot 10^{-4}$ М для панкреатина. Другой путь определения K_p заключается в использовании V^* (см. табл. 1 и 2). Эти две величины связаны выражением

$$K_p = -V^* \frac{K_m}{V}. \quad (5)$$

В результате получаются значения K_p , близкие к приведенным выше. Теперь можно определить K_m/K_p , которое для пепсина и панкреатина оказалось равным 300 (или 15) и 34 (или 16) соответственно. Кинетические параметры, полученные таким образом, приведены в табл. 3. Уравнение (3) с этими параметрами удовлетворительно описывает экспериментальные монотонные кинетические кривые (рис. 2).

Понятно, что приведенные параметры являются эффективными, поскольку, во-первых, в смеси действуют несколько ферментов, а во-вторых, и субстрат, и продукты реакции в ходе гидролиза непрерывно меняются как характером своим, так и местами.

Как видно из табл. 1 и 2, значения V^* , хотя и с большим разбросом, но определенно увеличиваются по модулю с увеличением концентрации субстрата. Это указывает или на смешанное ингибирование продуктами и субстратом, или на обратимость реакции. Уравнения, описывающие интегральные кривые, в обоих случаях имеют тот же вид, что и уравнение (2), но с другими значениями коэффициентов V^* и K^* . Имеющихся экспериментальных данных, однако, недостаточно для осуществления соответствующих расчетов.

Если сравнивать атакуемость различных белков, например, пепсином, т. е. на стадии, когда всасывания продуктов еще не происходит, но кинетические кривые имеют немонотонный характер, то значительно надежнее получать значения V^* и K^* из уравнения (2), чем определять перевариваемость по одной точке. Еще более показательны эффективные константы скорости реакции второго порядка, соответствующие отношению V^*/K^* при одинаковой весовой концентрации белка (табл. 4).

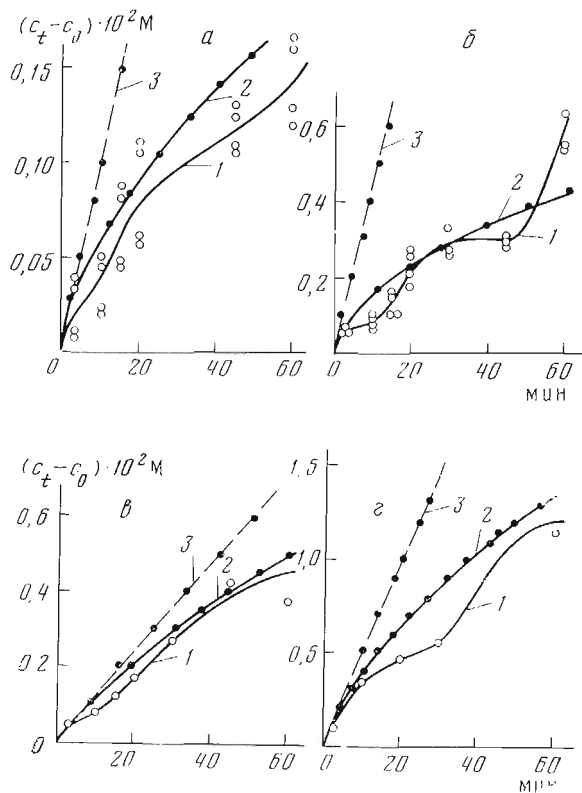


Рис. 2. Зависимость выхода аминокислотного азота от времени, полученная опытным путем (1), вычисленная по уравнению (3) с учетом (2) и без учета (3) ингибирования продуктами реакции для гидролиза казеина пепсином при концентрации субстрата 3,8 (а) и 1,5 г/л (б) и для гидролиза ПГК свободным панкреатином при концентрации субстрата 2 (в) и 7,5 г/л (г)

Для объяснения причины наблюдаемого колебательного процесса при ферментативном гидролизе белков и пептидов ранее мы выдвинули гипотезу о контроле гидролиза на участке торможения за счет разрушения третичной или вторичной структуры субстратов [9]. Однако колебательный процесс при гидролизе низкомолекулярных пептидов, а также периодическое уменьшение содержания аминокислотного азота в среде указывают на недостаточность такого предположения. Все это приводит к заключению, что причинами временного замедления прироста свободных аминогрупп или даже уменьшения их количества скорее являются образование сильных ингибиторов и обратная реакция образования пептидных связей под действием тех же протеаз типа пластеиновой реакции [11]. Ингибиторы протеаз полипептидной и даже аминокислотной природы широко распространены в живых организмах [12]. Отмечено конкурентное специфическое ингибирование протеаз некоторыми аминокислотами и низшими пептидами [13].

Аминокислоты действительно накапливаются в ходе гидролиза панкреатином. Уже через 1 ч их содержание доходит до 12 мол. % (табл. 5).

Для того чтобы экспериментально проверить действие свободных аминокислот на ход гидролиза, мы добавили к реакционной смеси через 1 мин 45 с после начала процесса раствор смеси аминокислот, соответствующий гидролизату дрожжей. Полученные при этом результаты приведены на рис. 3. Видно, что происходит резкое снижение количества аминокислотного азота, свидетельствующее о синтезе пептидов. Добавление такой же смеси аминокислот до начала гидролиза ПГК приводит к крайне неустойчивым

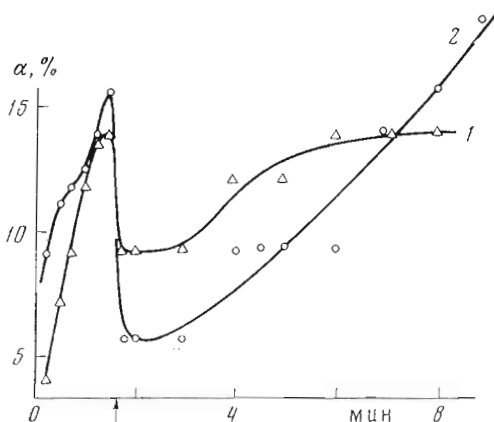


Рис. 3. Влияние добавления смеси аминокислот на ход гидролиза ПГК свободным панкреатином при концентрации субстрата 10 (1) и 30 г/л (2). Стрелкой показан момент добавления 0,5%-ного раствора аминокислот

результатам. Хотя обратимость действия протеаз неоднократно описана в литературе, интенсивная реакция включения аминокислот в пептиды наблюдалась при более высоких концентрациях.

В исследуемой нами системе синтез пептидов действительно имеет место, на что указывают результаты специально поставленных нами опытов со смесью меченых ^{14}C аминокислот. Оказалось, что даже при использовании более низких концентраций аминокислот, что диктовалось спецификой эксперимента, наблюдается включение меченых аминокислот в пептидную фракцию, осаждаемую трихлоруксусной кислотой (M больше 1000). Этот эксперимент дает качественное подтверждение предположению об обратимости гидролиза. Количественные данные не были получены, так как не учитывалась радиоактивность растворимой фракции.

Изложенные результаты показывают, что гидролиз белка ферментами желудочно-кишечного тракта сильно ингибируется продуктами реакции. Это ингибирование можно считать ответственным за неполное прохождение реакции гидролиза *in vitro*. Кроме того, во время ферментативной реакции наблюдается колебательный процесс, связанный с чередующимися гидролизом и синтезом полипептидных цепей.

Периодические реакции неоднократно наблюдались при ферментативных процессах, и их связывали главным образом с сильным угнетением реакции продуктами в многостадийных реакциях [14].

Таблица 5

Содержание свободных аминокислот в 1-часовом гидролизате ПГК панкреатином в мкмоль/мл

Аминокислота	Панкреатин		Аминокислота	Панкреатин	
	свободный	иммобилизованный		свободный	иммобилизованный
Lys	0,150	0,113	Cys		
His			Val		
Arg	0,083	0,067	Met		
Asp	0,149	0,098	Ile	0,040	0,034
Thr	0,080	0,059	Leu	0,475	0,366
Ser	0,082	0,062	Tyr	0,013	0,048
Glu	0,167	0,145	Phe	0,295	0,228
Pro		0,028	Итого	1,53	1,32
Gly		0,073	Общее содержание	13,39	10,89
Ala			NH_2 , мкмоль/мл		

Таблица 6

Время достижения различной глубины гидролиза казеина протеолитическими ферментами в присутствии продуктов реакции и без них (ч)

α , %	Казеин (15 г/л) + + пепсин (1 г/л)		ПГК (7,5 г/л) + + панкреатин (0,3 г/л)	
	А *	Б	А	Б
5	0,4	0,23	0,55	0,12
10	1,6	0,48	2,0	0,23
50	44	3,3	67	1,6
80	176	7,8	273	3,6

* А — с ингибированием продуктами реакции, Б — без ингибирования продуктами реакции.

Полученные кинетические данные позволяют в первом приближении рассчитать глубину гидролиза α в гипотетическом случае отсутствия продуктов реакции, что может представлять собой модель переваривания *in vivo*. Результаты расчета приведены в табл. 6. Разработанные нами методики открывают возможность оценки истинной перевариваемости пищевых белков.

Экспериментальная часть

Использованные реактивы: пепсин (КФ 3.4.11) с активностью 2600 ед. Олайнского завода химреактивов [15], панкреатин свиной, выделенный по методике [16], с активностью 0,210 мг белка/мин, кристаллический бычий сывороточный альбумин (Reanal, Венгрия), казеин, очищенный по Гаммарстену (Reanal), желатина пищевая. Смесь меченных ^{14}C аминокислот с уд. акт. 10 мкКи/мл.

Кинетику протеолиза измеряли согласно [17]. В четыре сосуда с термостатированными водяными рубашками при $37 \pm 0,1^\circ$ помещали по 30 мл раствора HCl (рН 1,8), вносили навеску белка, перемешивали 30 мин, после чего добавляли 30 мг пепсина. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 0,2 мл, к каждой пробе добавляли 0,8 мл раствора HCl (рН 1,8), 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), через 20 мин центрифугировали в течение 10—15 мин при 6000 об/мин и отбирали по 0,2 мл надосадочной жидкости для анализа на содержание аминного азота. Содержимое сосудов через 60 мин после начала действия пепсина доводили до рН 8,2—8,4 с помощью 1 н. NaOH , добавляли 30 мл 0,5 М NaHCO_3 . Раствор ПГК перемешивали 30 мин при 37° , добавляли 8—30 мг панкреатина и в ходе реакции отбирали для анализа пробы по 0,2 мл. К каждой пробе добавляли по 0,8 мл 0,5 М NaHCO_3 , перемешивали, добавляли 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, по окончании выделения CO_2 вновь перемешивали, оставляли на 20 мин и далее обрабатывали, как выше.

Определение NH_2 -групп проводили по модифицированному методу [18]. К 0,2 г надосадочной жидкости добавляли 2 мл раствора (0,2 г/л) 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (TNBS) в боратном буферном растворе с рН 9,2, выдерживали 30 мин при 37° , подкисляли 1 мл 1 н. HCl и фотометрировали при 340 нм против раствора TNBS. Калибровочную прямую строили по стандартному раствору *L*-лейцина. c_0 определяли экстраполяцией к $t = 0$ результатов измерения концентраций за первые 20 мин реакции; наклон полученной прямой принимали за v , а c_∞ вычисляли как максимальное количество NH_2 -групп, которое может образоваться при полном гидролизе пептидных связей.

Полученные экспериментальные значения $c_t - c_0$ наносили на график, проводили визуальную усредненную кривую, сглаживающую колебания,

Таблица 7

Абсолютное содержание радиоактивности ^{14}C в ходе гидролиза ПГК панкреатином
0,2 мл гидролизата на 1 счет

Время	Радиоактивность, имп/мин	Время	Радиоактивность, имп/мин
5 мин	66	60 мин.	15
15 »	303	2 ч	30
30 »	82	24 »	1606

Таблица 8

Пропускание	Объем, мл	Время, ч	Время контакта, мин	Степень гидролиза, %
I	90	1	2,7	38
II	120	2	4	46
III	150	5	8	71

и из этой усредненной кривой вычисляли по уравнению (2) параметры V^* и K^* . Везде приведены среднеквадратичные отклонения от среднего арифметического. Коэффициенты регрессий определяли по методу наименьших квадратов.

Действие смеси аминокислот на гидролиз ПГК панкреатином. 0,3 г (1%) или 0,9 г (3%) казеина в 30 мл 0,001 н. HCl (pH 1,8) перемешивали 30 мин при $37 \pm 0,1^\circ$, добавляли 30 мг пепсина, перемешивали еще 1 ч, доводили pH до 8,2—8,4 с помощью 1 н. NaOH, добавляли 30 мл 0,5 M NaHCO_3 , перемешивали 30 мин и добавляли 30 мг панкреатина. Через 1 мин 45 с после добавления панкреатина добавляли 5 мл раствора смеси L-аминокислот (5 мг/мл), составленной по образцу полного гидролизата дрожжей [19]. В ходе реакции измеряли содержание аминокислот азота. Аминный азот, внесенный с аминокислотами, вычитали из общего содержания. Полученные результаты приведены на рис. 3.

Включение меченых аминокислот. К 30 мл 0,5%-ного раствора ПГК при pH 8,2 добавляли 30 мг панкреатина и 0,25 мл раствора смеси [^{14}C]-аминокислот с уд. акт. 2,5 мкКи. Отбирали пробы по описанной выше методике; осадок, образовавшийся при действии ТХУ, отфильтровывали на миллиметровых фильтрах, многократно отмывали 10%-ной ТХУ с добавлением смеси немеченых аминокислот с конечной концентрацией 0,1% до полного освобождения от свободной радиоактивности и высушивали с помощью спирта и эфира. Контрольные пробы, содержащие только панкреатин и смесь меченых аминокислот, подвергали той же обработке. Радиоактивность осадка определяли с помощью счетчика Intertechnique SL-30 за вычетом радиоактивности контрольных проб (табл. 7).

Иммобилизация комплексного ферментного препарата свиного панкреатина. Для иммобилизации использовался промышленный препарат сополимера стирола и малеинового ангидрида (Стерлитомакский химический завод, мол. вес 22 000). К 10%-ной суспензии сополимера в воде при перемешивании постепенно в течение 24 ч добавляли 1 н. NaOH до получения прозрачного раствора и устанавливали pH 8,0—8,4 добавлением 1 н. HCl. К раствору 30 мг панкреатина в 10 мл 0,5 M NaHCO_3 прибавляли 50 мл полученного раствора сополимера стирола с малеиновой кислотой, перемешивали 1 ч, добавляли 0,1 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 3 мл воды, перемешивали 10—15 мин, добавляли 0,2 г $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 6 мл H_2O и перемешивали 2 ч. Выпавший осадок иммобилизованного ферментного препарата отделяли центрифугированием 15 мин при 6000 об/мин, промывали избытком дистиллированной воды до уменьшения поглощения при 280 нм

приблизительно в 80 раз. Осадок просушивали на фильтровальной бумаге и окончательно при 20° в вакуумном шкафу. После высушивания препарат измельчали до размера частиц 0,06 мм. Полученный препарат имел следующие характеристики: содержание азота 1,02%, активность 0,100 ед. акт./мин на 1 г сухого препарата. Выход по активности 48,5%.

Гидролиз ПГК иммобилизованным панкреатином в проточной системе. Через колонку с внутренним диаметром 1,6 см, содержащую слой 0,5 см (0,404 г) иммобилизованного панкреатина, пропускали 3 раза раствор ПГК, каждый раз промывая катализатор 0,5 М карбонатным буферным раствором, рН 8,4. Результаты показаны в табл. 8.

Тот же препарат в статических условиях показал степень гидролиза за 1 ч 35%, за 3 ч — 40% и за 5 ч — 43%.

Авторы выражают благодарность Л. С. Слободяниковой (ИНЭОС АН СССР) за разработку методики получения иммобилизованных ферментных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хотенович А. В., Ведепесва Н. А., Кубарова З. И. (1972) Прикл. биохим. и микробиол., 8, 186.
2. Покровский А. А., Ертанов И. Д. (1965) Вопр. питания, № 3, 38.
3. Evans R. I. (1946) Arch. Biochem., 11, 15.
4. Sheffner A. Z., Eckfeldt I. A., Spector H. J. (1956) J. Nutr., 60, 105.
5. Fraugne R. et al. (1973) Ann. nutr. et aliment., 27, 111.
6. Слоицкий Г. Л., Браудо Е. Е., Ертанов И. Д., Толстогузов В. Б., Бондарева Э. С., Плащина И. Г. (1970) Вопр. питания, № 6, 25—31.
7. Bauer-Staeb G., Bouvard F. (1973) Lebensm.-Wiss. und Technol., 6, 219—223.
8. Coli R., Buono M., Parretta P., Simonetti M. S. (1975) Boll. Soc. ital. biol. speriment., 51.
9. Belikow W. M., Antonowa T. W. (1976) Nahrung, 19, 593—596.
10. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики. с. 179, Изд-во МГУ.
11. Hass M. G., Venkatakrisnan R., Ryan C. A. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1941.
12. Aso K., Yamashita M., Arai S., Suzuki J., Fujimaki M. (1977) J. Agric. and Food Chem., 25, 1138—1142.
13. Кривцман М. Г., Конинова А. С., Короткина Р. Н. (1975) Биохимия, 40, 1131—1134.
14. Беликов В. М., Мартынова Н. С. (1971) Мол. биол., 5, 122.
15. Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. (1977) Кинетика биологических процессов, с. 232—253, Изд-во МГУ.
16. Червинов М. П. (1955) Укр. биохим. ж., 27, 94—98.
17. Добрынина В. И., Свешникова Е. А. (1958) Руководство к практическим занятиям по биологической химии, с. 304, Медгиз, М.
18. Kharatyan S. G., Antonowa T. W., Wolnowa A. I., Belikow W. M. (1975) Nahrung, 19, 61—64.
19. Беликов В. М., Латов В. К., Цырякин В. А., Сергеев В. А. (1976) Микробиол. прм-сть, вып. 3 (134), 1—13.

Поступила в редакцию
2.IX.1978

KINETICS OF CASEIN HYDROLYSIS WITH PROTEOLYTIC ENZYMES

В. М. БЕЛИКОВ, Т. В. АНТОНОВА, В. А. КВАСОВ

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences of
the U.S.S.R., Moscow*

The kinetics of the amino nitrogen increase during the consecutive action of pepsin and pancreatin on casein are studied. The reaction has an oscillating character. The monotonous curves are described by the equation for the strong inhibition by the reaction products. The kinetic parameters are determined. The addition of labeled amino acids leads to their incorporation into the polypeptide fraction. The data obtained allow to calculate the depth of hydrolysis in the absence of products and to propose a model for the determination of food protein digestibility.