

文章编号:1673-1689(2006)02-0048-04

## 高效液相色谱法测定环二酰胺酶催化水解 马来酰亚胺动力学参数

石亚伟, 崔丽方, 袁静明

(山西大学生物技术研究所, 山西太原 030006)

**摘要:** 采用高效液相色谱法(HPLC)分析并测定了环二酰胺酶水解马来酰亚胺反应的动力学参数。以 Symmetry® C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)为色谱柱, 甲醇:10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5)体积比 5:95 为流动相, 检测波长为 255 nm, 流速 1.0 mL/min 等色谱条件, 马来酰亚胺与其水解产物马来酰胺酸得到较理想的分离效果。按照 Lineveaver-Burk 的双倒数作图法求得环二酰胺酶催化马来酰亚胺水解的动力学参数为  $K_m = 39.09$  mmol/L,  $V_{max} = 154.02$  μmol/(min·mg),  $V_{max}/K_m = 3.94$ ,  $k_{cat} = 28\ 750.4$  min<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_m = 735.5$  mmol/(L·min)。30 min 环二酰胺酶催化底物马来酰亚胺转化率达到 95%。该方法快速、准确、重复性好。

**关键词:** 高效液相色谱; 环二酰胺酶; 马来酰亚胺; 马来酰胺酸; 动力学参数

中图分类号: TS 201.25

文献标识码: A

## Determination of Kinetic Parameters of a Cyclic Imidase Hydrolyzing Maleimide by High Performance Liquid Chromatography

SHI Ya-wei, CUI Li-fang, Yuan Jing-ming

(Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** Kinetic parameters of a cyclic imidase with maleimide as the substrate was assayed by HPLC method. The separation of the reaction mixture was conducted on a Symmetry C<sub>18</sub> column with methanol: 10 mmol/L phosphate buffer, pH 6.5 (5:95 v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and the detection was carried out at 255 nm. Under the above conditions, maleimide and maleamic acid were perfectly separated with a good linear relationship between sample amounts and chromatograms. Under the optimal conditions of enzyme reaction, the yield of maleamic acid catalyzed by cyclic imidase reached 95% within 30 min. Kinetic parameters of the cyclic imidase for hydrolyzing substrate maleimide were calculated based on Lineveaver-Burk method e. g.  $K_m = 39.09$  mmol/L,  $V_{max} = 154.02$  μmol/(min·mg),  $V_{max}/K_m = 3.94$ ,  $k_{cat} = 28750.4$  min<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_m = 735.5$  mmol/(L·min). The method is rapid, accurate and reproducible.

**Key words:** HPLC; cyclic imidase; maleimide; maleamic acid; kinetic parameters

收稿日期: 2005-09-10; 修回日期: 2005-10-20.

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20030142).

作者简介: 石亚伟(1971-), 男, 山西左权人, 副教授, 理学博士.

环酰胺酶类(EC. 3. 5. 2)包括海因酶、二氢嘧啶酶、环二酰胺酶、酰亚胺酶、尿囊素酶等水解酶,广泛存在于细菌、酵母和霉菌以及高等动植物中<sup>[1]</sup>。这类酶大多参与嘧啶类化合物以及异生物质的体内代谢。在20世纪70年代后期开始将海因酶用于生产D型和L型天然或非天然氨基酸,目前已达到工业化水平。环二酰胺酶(cyclic imidase, EC. 3. 5. 2. 16)是最近报道的环酰胺酶类中的一个亚类,它和其他环酰胺酶一样可以水解海因、二氢嘧啶等底物。但它在蛋白质氨基酸序列同源性方面明显不同于前者,而且相对分子质量比较小。与水解环脲脲相比,环二酰胺酶对简单的环酰亚胺(马来酰亚胺,琥珀酰亚胺等)具有更高的活性<sup>[1-2]</sup>。Ogawa等对250种细菌、酵母和霉菌的环二酰胺酶的活性进行调查,发现大多微生物具有该酶的活性<sup>[3]</sup>。Ogawa等对 *Blastabater Sp. A17p-4* 的研究发现,环二酰胺酶在体内参与二元酸的合成,反应产物可进入TCA循环。环二酰胺酶有可能在手性有机酸的合成等方面有潜在的应用价值。

由于环酰亚胺及其水解产物大多没有明显的显色反应,通常的比色法不能对酶反应产物进行检测。高效液相色谱具有分析速度快、用量少、检测精度高等特点<sup>[4]</sup>,可利用该法来定性或定量分析马来酰亚胺及其产物马来酰胺酸。为此,作者利用本实验室纯化的具有水解马来酰亚胺能力重组环二酰胺酶,建立了用高压液相色谱测定环二酰胺酶水解反应的动力学常数的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

重组环二酰胺酶由作者所在实验室制备并纯化,达电泳纯,比活为35.8 U/mg。马来酰亚胺和马来酰胺酸均为Sigma-Aldrich公司产品,其他试剂均为分析纯或色谱纯。

美国Waters公司1525型高效液相色谱仪:包括两台Waters 1525型高压泵,Waters 2487型双波长检测器;Millipore公司超纯水发生器;色谱柱Symmetry® C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm)(美国Waters公司制造);手动进样器;北京市六一仪器厂WD-9415B型超声波清洗机,U-2010紫外-可见分光光度计。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 色谱条件** 色谱分离柱:Symmetry® C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:V(甲醇):V(10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液 pH 6.5)

体积比为5:95;流速1.0 mL/min;检测波长255 nm;进样量每次10 μL;柱温25℃。

**1.2.2 标准样品制备** 分别精确称取一定量的马来酰亚胺和马来酰胺酸溶于10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5)中,配制成200 mmol/L的标准溶液,然后用相应缓冲液稀释成不同的标准质量浓度,分别进样,用于HPLC分析。

**1.2.3 分析样品制备** 不同浓度的马来酰亚胺200 μL加适量环二酰胺酶,37℃反应不同时间,沸水浴10 min终止反应后于13 000 r/min离心10 min,取上清液10 μL进样。

### 1.2.4 相对标准偏差

$$\text{平均偏差}(\bar{d}) = \frac{\sum_{i=1}^n |d_i|}{n}$$

$$\text{标准偏差}(s) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{n-1}}$$

$$\text{相对标准偏差(RSD\%)} = (s/\bar{x}) \times 100\%$$

## 2 实验结果

### 2.1 检测波长的选择

用10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5)精确配制标准马来酰亚胺和马来酰胺酸溶液,在紫外可见分光光度计上进行全波长扫描。结果表明,马来酰亚胺在240~310 nm处有吸收,马来酰胺酸在220~270 nm处有吸收。两者在265 nm处均有较强的吸收峰,显然在该波长下,难以同时检测上述两种物质的分离效果。当选用255 nm时,两标准品的吸收值和分离效果均比较理想。因此,选择255 nm作为这两种化合物在HPLC检测中的检测波长。

### 2.2 流动相的优化

C<sub>18</sub>色谱柱对极性大的物质保留时间短,极性小的物质保留时间长<sup>[5]</sup>。马来酰亚胺分子本身属平面结构,极性较弱,相对保留时间较长,若被水解后其平面结构被破坏,产物马来酰胺酸呈现一个游离的羧基,所以极性较强,相对保留时间短。另外,对流动相的pH值和有机溶剂含量也进行了优化,比较NaAc缓冲液(pH 5.0)和K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5, pH 7.0, pH 8.0)对两化合物分离的影响,选择10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5)分离效果较好。进一步以甲醇:10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>~KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 6.5)为洗脱相,体积比分别为10:90, 5:95, 3:97。当两者比例

为5:95,流速为1.0 mL/min,检测波长为255 nm,柱温为25 ℃时,获得了比较满意的分离效果,马来酰胺酸和马来酰亚胺保留时间分别为1.1559 min和2.2343 min(见图1)。显然,这一结果可以作为马来酰亚胺酶解产物的分离条件。

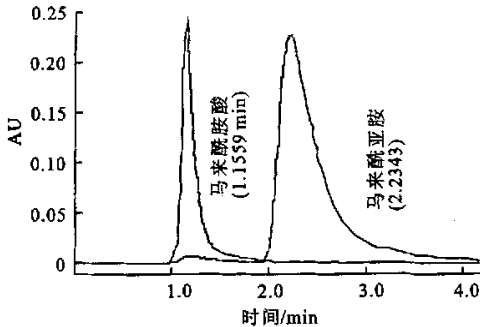


图1 HPLC法分离分析马来酰亚胺和马来酰胺酸

Fig.1 HPLC chromatograms of standard maleimide and maleamic acid

### 2.3 重现性分析

在上述色谱条件下,对一样品溶液,分别精密吸取10 μL,重复测定5次,计算其峰面积积分值,经统计分析,其相对标准偏差(RSD)马来酰亚胺为:1.9%,马来酰胺酸为:1.7%,符合进样精密度。

### 2.4 稳定性试验

在上述色谱条件下,对一样品溶液,在0, 0.5, 1, 2, 4, 6 h时,分别精密吸取10 μL进行测定,计算其峰面积积分值,马来酰亚胺和马来酰胺酸的相对标准偏差(RSD)分别为2.0%,1.7%,表明在所测定时间内分析物质是稳定的。

### 2.5 标准曲线

在上述分离条件下制作工作曲线。分别精密吸取200 mmol/L马来酰亚胺标准品溶液2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μL; 200 mmol/L马来酰胺酸标准品溶液2.0, 5.0, 8.0, 10.0 μL注入色谱仪进行测定,以样品进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标绘制标准曲线,用线性回归法求其回归方程,马来酰亚胺回归方程为: $y = 1.5633 \times 10^7 x$  ( $r = 0.9958$ ),马来酰胺酸回归方程为: $y = 0.2155 \times 10^7 x$  ( $r = 0.9913$ ),表明马来酰亚胺与马来酰胺酸在所测范围内有良好的线性关系(见图2)。

### 2.6 环二酰胺酶水解马来酰亚胺的转化率分析

取20.0 mmol/L马来酰亚胺200 μL加适量环二酰胺酶,37 ℃分别反应0, 10, 30 min后,沸水浴10 min终止反应,13 000 r/min离心10 min,吸取10 μL上清液进样,在标准色谱条件下分析不同反应时间环二酰胺酶水解马来酰亚胺的色谱图见图

3。结果显示:0.75 μg环二酰胺酶与200 μL 20.0 mmol/L马来酰亚胺分别于37 ℃反应10 min和30 min,环二酰胺酶催化马来酰亚胺生成马来酰胺酸的转化率分别为50%和95%。

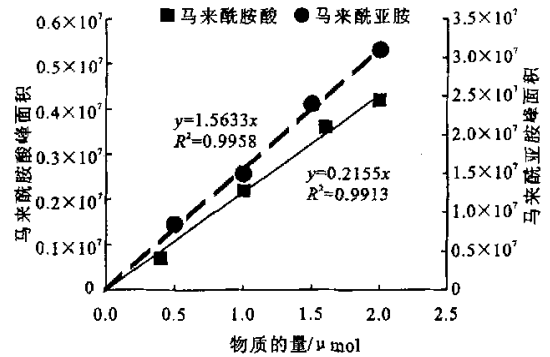


图2 马来酰亚胺和马来酰胺酸的标准曲线

Fig.2 Standard curves of maleimide and maleamic acid

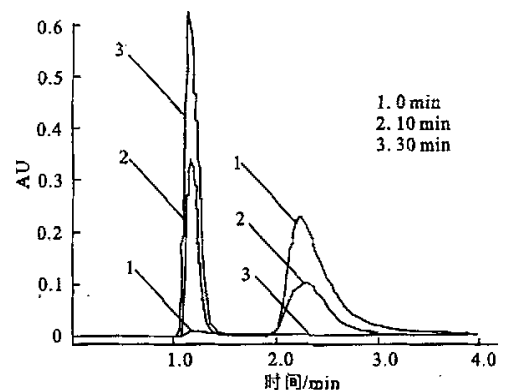


图3 环二酰胺酶催化马来酰亚胺水解产物的分离效率

Fig.3 Separation efficiency of the maleimide hydrolyzate catalyzed by cyclic imidase

### 2.7 环二酰胺酶催化马来酰亚胺水解的基本动力学参数

分别取5.0, 7.5, 10.0, 15.0 mmol/L的马来酰亚胺200 μL,加适量环二酰胺酶,37 ℃反应10 min,沸水浴10 min终止反应后,13 000 r/min离心10 min,吸取10 μL上清液进样,在标准色谱条件下,以不加酶的相同体系作为对照,计算反应组与对照组底物峰面积积分值差值,将其代入标准曲线,得上述反应条件下,环二酰胺酶催化水解底物的量(μmol)。按照Lineweaver-Burk的双倒数作图法求 $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $V_{max}/K_m$ , 及  $k_{cat}/K_m$ , 结果见表1。

表1 环二酰胺酶水解马来酰亚胺的动力学参数

Tab.1 Kinetic parameters of the cyclic imidase

参数	数值
$K_m$ /(mmol/L)	39.09
$V_{max}$ /( $\mu$ mol/(min·mg))	154.02
$V_{max}/K_m$	3.94
$K_{cat}$ /min <sup>-1</sup>	28750.4
$(K_{cat}/K_m)$ /(mmol/(L·min))	735.5

### 3 讨论

马来酰亚胺在环二酰胺酶的催化作用下,发生化学位移,裂解成马来酰胺酸可能与先前提出的酰亚胺酶催化水解机制相符<sup>[6-7]</sup>,尽管马来酰亚胺缺少亚酰胺功能团的 $\alpha$ 氮原子,但分子仍旧是平面结

构,很容易被亲核攻击,表明越趋于平面结构的底物越利于被环二酰胺酶催化。

高效液相色谱具有分辨率高、分析速度快、定量准确、重复性好等优点。随着 HPLC 仪器的不断改进,灵敏度不断提高,对目的产物的分离分析条件亦在不断修正,越来越多的酶都在借助 HPLC 来测定其酶活性或转化产物<sup>[8-9]</sup>。作者利用 HPLC 方法确定了环二酰胺酶水解马来酰亚胺活性,且计算出以马来酰亚胺为底物时的  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $V_{max}/K_m$  及  $k_{cat}/K_m$  值。同时,与该酶水解其它环酰胺底物(二氢尿嘧啶,海因,苯海因,对羟基苯海因等)比较,马来酰亚胺是该酶的最适底物。进一步确认环二酰胺酶对简单的环酰亚胺具有更高的活性及亲和力,为研究有机亚酰胺类的新陈代谢和生物转化提供了一种快速、有效的方法。

### 参考文献:

- [1] Soong C L, Ogawa J, Shimizu S. Cyclic ureide and imide metabolism in microorganisms producing a D-hydantoinase useful for D-amino acid production[J]. *JMolCatalB(Enzymatic)*, 2001,12:61-70.
- [2] Ogawa J, Soong C L, Honda M, et al. Imidase, a dihydropyrimidinase-like enzyme involved in the metabolism of cyclic imides[J]. *Eur J Biochem*, 1997,243:322-327.
- [3] Soong C L, Ogawa J, Sukiman H, et al. Distribution of cyclic imide-transforming activity in microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998,158:51-55.
- [4] 钮利喜,石亚伟,纪颖彤,等. DL-对羟基苯海因及其工程菌转化产物的高效液相色谱分析[J]. *色谱*, 2005,23(2):208.
- [5] 沈鹤柏,周文骏,杨永桃,等. ODA-铈配合物定位水解切断 DNA 的研究[J]. *中国科学: B 辑*, 2003,33(3):268-272.
- [6] Yang Y S, Ramaswamy S, Jakoby W B. Rat liver imidase[J]. *J Biol Chem*, 1993,268: 10870-10875.
- [7] 陈侃,陈衍强,徐修容. 高效液相色谱法测定非天然氨基酸的光学纯度[J]. *色谱*, 2000,18(1):14.
- [8] Hardy G P, Van Hemert F J, Meijer A J, et al. An automated high-performance liquid chromatography procedure for the quantitation of L- and D-amino acid by means of stepwise precolumn derivatization[J]. *Anal Biochem*, 2001,291(2):297.

(责任编辑:李春丽)