

# 粘质沙雷氏菌马来酸顺反异构酶表达纯化及酶学性质

王亚<sup>1,2</sup>, 崔文璟<sup>1,2</sup>, 周丽<sup>1,2</sup>, 刘中美<sup>1,2</sup>, 周哲敏<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 从粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)中扩增得到马来酸顺反异构酶基因。将该基因连接到 pET24a 载体上,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中实现了成功表达。酶学性质研究表明,重组酶的比酶活力为 48.01 U/mg。其最适温度为 37 °C,最适 pH 为 8.4。在最适反应条件下, $K_m$  值为 4.20 mmol/L, $V_{max}$  为 1.27 mmol/(L·min), $k_{cat}$  为 4.38 s<sup>-1</sup>,催化效率  $k_{cat}/K_m$  为 1.04 L/(mmol·s)。研究结果进一步显示,马来酸顺反异构酶具备良好的热稳定性(55 °C半衰期为 1.5 h)及高达 99%以上的转化率,为马来酸顺反异构酶的进一步研究和工业应用制备高纯度的富马酸提供了理论基础和支持。

**关键词:** 马来酸顺反异构酶;基因重组与表达;酶学性质;酶热稳定性

中图分类号:Q 55 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)11—1204—06

## Purification and Characterization of Maleate Cis-Trans Isomerase from *Serratia marcescens*

WANG Ya<sup>1,2</sup>, CUI Wenjing<sup>1,2</sup>, ZHOU Li<sup>1,2</sup>, LIU Zhongmei<sup>1,2</sup>, ZHOU Zhemin<sup>\*</sup>

(1. School of Biotechnology Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The gene of maleate cis-trans isomerase (MaiA) from *Serratia marcescens* was cloned and successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and was purified. The specific activity of the purified enzyme was 48.01 U/mg. The optimum temperature was 37 °C and the optimum pH was 8.4. Under the optimum condition, the  $K_m$  value was 4.2 mmol/L, the  $V_{max}$  value was 1.27 mmol/(L·min), the  $k_{cat}$  value was 4.38 s<sup>-1</sup> and the catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) was 1.04 L/(mmol·s). Furthermore, the research showed that the MaiA had high thermostability ( $t_{1/2}$ =1.5 h). Meanwhile, maleate could almost be converted to fumarate completely by the recombinant MaiA with high efficiency up to 99%. The results in this study will be useful for further research and industrial applications of maleate cis-trans isomerase.

**Keywords:** maleate cis-trans isomerase, gene recombinant and expression, enzymatic properties, thermostability

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 教育部新世纪优秀人才项目(NCET-10-0461); 教育部科学研究重大项目(311023)。

\* 通信作者: 周哲敏(1969—), 男, 河北石家庄人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物酶学与酶工程方面的研究。

E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

富马酸(Fumaric acid),又称反丁烯二酸、延胡索酸,是一种天然存在的有机酸<sup>[1]</sup>。作为一种重要的四碳平台化合物和精细化工产品<sup>[2]</sup>,富马酸广泛用于食品、医药、化工、涂料、增塑剂等领域<sup>[3]</sup>。如在食品方面,可用作口味纯正的酸味剂、风味增强剂。在医药方面,可以用于生产解毒药二巯基丁二酸钠等,富马酸铁则广泛应用于医学上治疗人体的小红血球贫血病。工业级富马酸主要用于生产不饱和聚酯树脂和醇酸树脂,以及用作生产电泳漆。另外,富马酸可以通过生物转化生产一些具有其他工业用途的重要化合物原料,如L-天冬氨酸、L-丙氨酸和L-苹果酸等。目前,富马酸的生产大都通过石化方法由马来酸酐制备得到,然而化学合成法存在成本高、副产物多及可能造成的环境污染等问题,这使得人们的眼光逐渐转向环境友好的生物法来制备富马酸<sup>[4]</sup>。生物转化法多由固定化菌体细胞催化<sup>[5]</sup>,此法会使产物富马酸(重要的三羧酸循环中间代谢产物)被菌体本身代谢转化成其他副产物,造成转化率降低,而酶法转化则可以有效地解决这个问题。作者本研究发现,马来酸顺反异构酶几乎可以将底物马来酸完全转化为富马酸,这为生物酶法工业化制备高纯度富马酸提供了有利的科学依据。

马来酸顺反异构酶(EC 5.2.1.1, Maleate cis-trans Isomerase, MaiA)是一种能够将马来酸(顺丁烯二酸)催化转化成富马酸(反丁烯二酸)的异构酶,能够在碳碳双键不断裂的情况下,实现顺式丁烯二酸向反式丁烯二酸的异构化,属于天冬氨酸、谷氨酸消旋酶超家族<sup>[6]</sup>。由于具有催化反应pH范围宽泛、较低的 $K_m$ 值以及较高平衡常数的特点,马来酸顺反异构酶被认为是可用于工业生产富马酸的有潜力的生物催化剂之一<sup>[7]</sup>。马来酸顺反异构酶广泛存在于一些可吸收利用马来酸的细菌中,如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、变形杆菌属(*Proteus*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)等。但多数马来酸代谢菌中此酶的活力较低、热稳定性较差,制约了马来酸顺反异构酶在工业生产中的应用<sup>[8]</sup>。

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)来源的马来酸顺反异构酶在室温有较好的热稳定性,酶活力也相对其他菌株来源的要高<sup>[7]</sup>。但是,关于*S. marcescens*来源的马来酸顺反异构酶,尚无高效表达和制备以及详细的酶学性质方面的报道。本研究实现了*S.*

*marcescens*来源的马来酸顺反异构酶在大肠杆菌中的高效表达,并对重组酶进行了分离纯化及酶学性质等研究。在此基础上,研究了马来酸浓度对反应速度的影响以及不同浓度的马来酸完全转化为富马酸的反应时间,为马来酸顺反异构酶的工业化应用提供了实验依据和理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株与质粒** 粘质沙雷氏菌 *S. marcescens*: NITE Biological Resource Center (NBRC); *Escherichia coli* BL21(DE3), 质粒载体 pET24a(+): Novagen 公司产品。

**1.1.2 主要试剂与仪器** *Pfu* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等: 日本宝生物工程(大连)有限公司产品; 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒: 上海生物工程公司; AKTA 蛋白纯化系统: 通用电气医疗器械集团产品; His Trap FF crude 镍柱: 通用电气医疗器械集团产品。

**1.1.3 引物设计与合成** 根据 Kazuhisa 等人<sup>[9]</sup>关于 *S. marcescens* 马来酸顺反异构酶报道的基因序列设计引物。分别在上游引入 *EcoR* I 酶切位点和保护碱基, 下游引入 *Hind* III 酶切位点, 在 C 端表达 His 标签。试验中所用到的引物由上海生物工程公司合成。引物序列为(划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切位点):

P1: 5'-CCGGAATTCATGAGCAACCACTACCGCA-3';

P2: 5'-CCCAAGCTTATAAGCGCCGGACAG-3'。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 *MaiA* 基因的克隆** 以 *S. marcescens* 的基因组 DNA 为模板, 以 P1、P2 为引物 PCR 扩增。PCR 扩增条件如下: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 90 s, 68 °C 退火 25 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环; 10 °C 保温。

**1.2.2 马来酸顺反异构酶表达载体的构建** 将 PCR 扩增到的 *MaiA* 基因产物用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 连接到用同样限制性内切酶酶切的质粒载体 pET24a(+) 上, 获得重组质粒 pET24a-*MaiA*。

**1.2.3 重组蛋白 *MaiA* 的诱导表达** 将重组质粒 pET24a-*MaiA* 转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3),

获得马来酸顺反异构酶表达型重组大肠杆菌 BL21 (pET24a-MaiA)。挑取 BL21(pET24a-MaiA) 平板单菌落, 接种于 5 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡过夜培养。将 500  $\mu\text{L}$  上述过夜培养物接种于 50 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.8, 加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 20  $^{\circ}\text{C}$  诱导培养 20 h, 收集菌体超声破碎, 通过 SDS-PAGE 分析鉴定重组蛋白。

**1.2.4 MaiA 重组蛋白的纯化** 将重组菌体溶于结合缓冲溶液 (10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Imidazole), 超声破碎, 离心, 上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。用 10 倍柱体积的结合缓冲溶液平衡 1 mL 的 His Trap FF crude 柱子, 取 60 mL 的样品上样, 用 20 倍柱体积的结合缓冲溶液洗去非特异性吸附的蛋白质, 分别用 100、300、500 mmol/L 咪唑的缓冲液来洗脱蛋白质, 每个浓度梯度用 10 倍的柱体积洗脱, 收集洗脱峰后, SDS-PAGE 鉴定纯化结果。

**1.2.5 蛋白质浓度的测定** 蛋白质定量采用常规的 Bradford 法<sup>[10]</sup>。

**1.2.6 MaiA 重组蛋白的活性测定** 取 450  $\mu\text{L}$  用 pH 8.4 反应缓冲溶液适当稀释的酶液, 加入 50  $\mu\text{L}$ 、1 mol/L 马来酸 (KOH 调至 pH 8.4) 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 20 min, 经 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤后, 产物富马酸用 HPLC 进行测定<sup>[11]</sup>。

为了能够准确测定马来酸顺反异构酶的活力, 作者结合文献[11]报导, 改进了 HPLC 流动相中有机相与无机相的配比及 pH 值。HPLC 色谱柱为 La Chrom C18 (5  $\mu\text{m}$  4.6×250 mm); 流动相为体积分数 8% 的甲醇水溶液, 流速 0.6 mL/min; UV 检测器检测波长为 210 nm, 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。在该条件下, 马来酸与富马酸得以完全分离开, 见图 1。

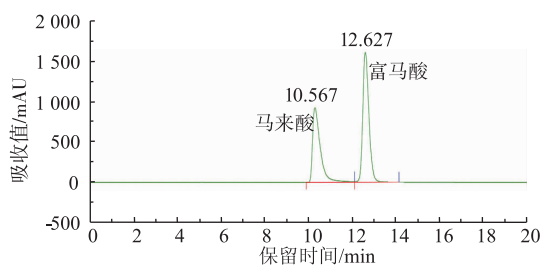


图 1 马来酸和富马酸混合标样 HPLC 色谱图

Fig. 1 Separation of maleate and fumarate by HPLC

马来酸顺反异构酶酶活定义: 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.4 的条件下, 每分钟转化底物马来酸生成 1  $\mu\text{mol}$  产物富马酸所需的酶量定义为一个酶活力单位 1 U。

### 1.2.7 马来酸顺反异构酶的酶学性质研究

1) 相对酶活力的定义: 以在 37  $^{\circ}\text{C}$  时测得的酶活力为分母, 得到各个温度下测定的相对酶活。

2) 最适温度的测定: 分别于 15、25、35、45、55、65  $^{\circ}\text{C}$  下测定马来酸顺反异构酶的活性, 并以 MaiA 的相对酶活对温度作图。

3) 最适 pH 值的测定: 分别于 pH 3.6、4.0、5.0、5.9、7.0、8.0、9.2、9.5、10.0、10.6 条件下测定马来酸顺反异构酶的活性, 并以 MaiA 的相对酶活对 pH 值作图。pH 3.6、4.0、5.0 采用的缓冲溶液为 50.0 mmol/L NaAc-HAc, pH 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.2 采用的缓冲溶液为 50.0 mmol/L NaHPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 9.2、9.5、10.0、10.6 采用的缓冲溶液为 50.0 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>。

4) 热稳定性的测定: 置马来酸顺反异构酶于 55  $^{\circ}\text{C}$  和 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴保温, 每隔 30 min 取样终止反应, 检测酶活, 共检测 3 h, 并以相对酶活的百分比对保温时间作图。

5) 底物对马来酸顺反异构酶催化效率的影响及转化时间的测定: 置马来酸顺反异构酶于不同底物浓度下反应, 测定初始反应速度并测定完全转化底物所需的时间。

6) 反应动力学参数的测定: 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.4 条件下, 纯酶液与不同浓度的底物马来酸 (终浓度 10、20、30、40 mmol/L) 反应, 测定其酶反应的初始速度, 以双倒数作图法确定  $K_m$  和  $k_{cat}$ 。

## 2 结果与讨论

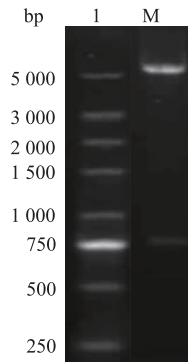
### 2.1 马来酸顺反异构酶基因的克隆

用引物 P1 和 P2, 从粘质沙雷氏菌基因组中 PCR 扩增得到目的基因片段, 该基因克隆于 pET24a 载体中, 重组质粒 pET24a-MaiA 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切, 得到了大小为 753 bp 的目的条带, 见图 2, 表明外源基因已经成功连接到表达载体上。

### 2.2 马来酸顺反异构酶在大肠杆菌中的诱导表达

将重组质粒 pET24a-MaiA 转化感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3), 获得重组大肠杆菌 BL21 (pET24a-MaiA)。经诱导表达后, SDS-PAGE 电泳获得 28 000 左右的电泳条带, 见图 3 泳道 2 所示, 与 MaiA 预期

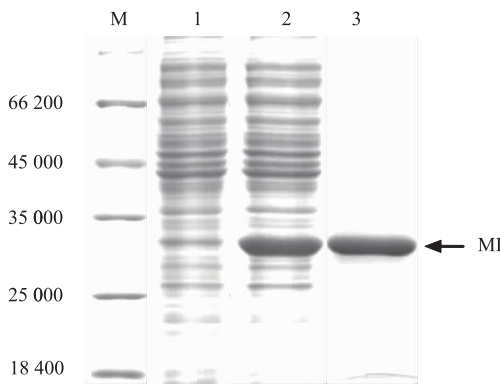
的理论相对分子质量大小相符(其C端含有His标签,大小约为28 400),表明*MaiA*重组蛋白在大肠杆菌中实现了成功表达。



M:DNA maker S plus;1,*EcoR* I and *Hind* III digestion of recombinant pET24a-*MaiA*

图2 pET24a-*MaiA*质粒双酶切验证电泳图

Fig. 2 Identification of *MaiA* by enzyme digestion



M:Protein Maker;1:the control/cell-free extract of BL21 (pET24a);2:cell-free extract of BL21 (pET24a-*MaiA*);3: purified protein

图3 重组*MaiA*的表达与纯化过程的SDS-PAGE

Fig. 3 Expression and purification of *MaiA* in *E. coli*.

### 2.3 马来酸顺反异构酶的分选纯化

马来酸顺反异构重组酶经 His Trap FF crude 镍柱纯化后 SDS-PAGE 电泳分析结果见图3。表明一步纯化获得了较纯的目的蛋白质(图3中泳道2),可以用于进一步的酶学性质研究,纯化效率见表1。

### 2.4 重组*MaiA*的酶学性质

**2.4.1 最适温度** 马来酸顺反异构酶重组蛋白在不同的温度下的相对酶活力见图4。该酶的最适温度为37℃,温度超过45℃和低于35℃时,相对酶活力急剧下降。

表1 马来酸顺反异构酶的纯化

Table 1 Purification scheme for the recombinant *MaiA*

纯化步骤	总酶活/ U	总蛋白质质量/ mg	比酶活/ (U/mg)	纯化 倍数	回收率/ %
Crude enzyme	2018.28	260.40	7.75	1	100
Histrap FF crude kit	821.03	17.10	48.01	6.19	40.68

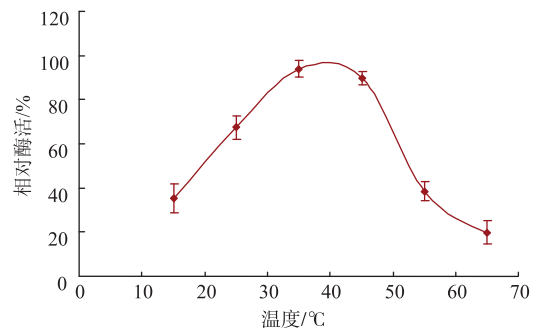


图4 马来酸顺反异构酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of *MaiA*

**2.4.2 最适 pH** 重组酶在不同的 pH 条件下的相对酶活力见图5。该酶在 pH 7~9 范围内,酶活力保持80%以上;pH值高于9.0或低于7时酶活力迅速降低,表明最适 pH 值为8.4。

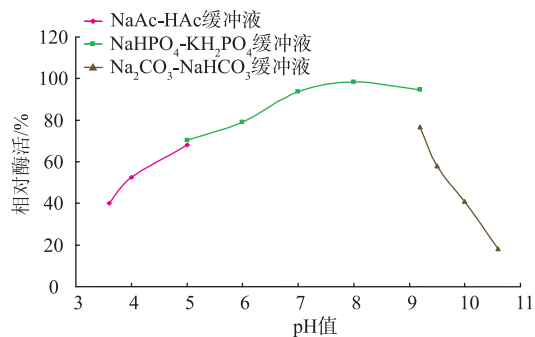


图5 马来酸顺反异构酶的最适 pH 值

Fig. 5 Optimum pH of *MaiA*

**2.4.3 马来酸顺反异构酶的热稳定性** 重组酶分别在55℃和60℃放置不同时间后其残留酶活力见图6。在55℃时,马来酸顺反异构酶的半衰期约为1.5 h;而在60℃,半衰期约为30 min。

**2.4.4 底物对马来酸顺反异构酶催化效率的影响** 重组酶的反应初速度变化见图7。当初始底物低于50 mmol/L时,反应的初速度成线性增长;高于500 mmol/L时,反应速度趋于最大;高于2 000 mmol/L

时,反应初速度开始下降,说明过高的底物浓度可能对反应速度产生了抑制作用。

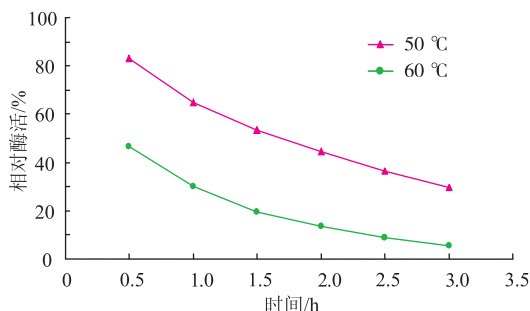


图 6 马来酸顺反异构酶的热稳定性  
Fig. 6 Thermostability of MaiA

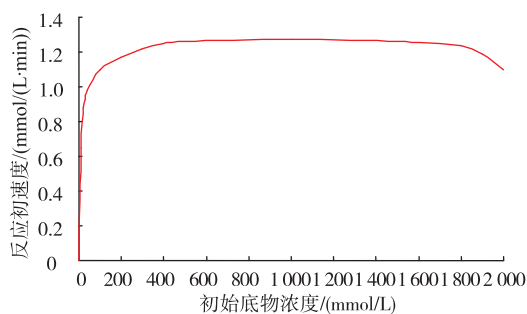


图 7 初始底物浓度对马来酸顺反异构酶催化初速度的影响  
Fig. 7 Effect of substrate concentration on MaiA

在测定底物浓度对 MI 催化效率影响的同时,作者发现,反应体系中的底物马来酸几乎可以完全转化为产物富马酸,转化率可达 99%以上。尽管底物浓度达到 2 000 mmol/L 以上时反应速度会降低,马来酸完全转化为富马酸的时间会延长,但是依然不影响酶的转化效率,见图 8。当底物浓度为 500 mmol/L 和 1 000 mmol/L 时,完全转化时间约为 3 h 和 6 h,当底物浓度升高至 2 000 mmol/L 时,需将近 21 h 将底物完全转化。

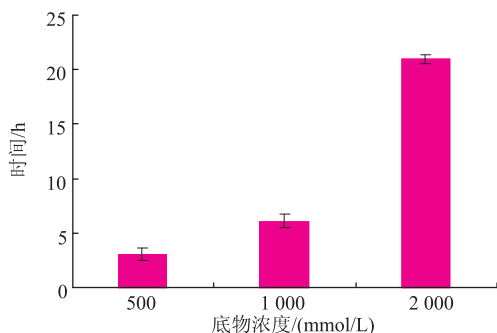


图 8 底物浓度对转化时间的影响  
Fig. 8 Effect of substrate concentration on conversion time

**2.4.5 马来酸顺反异构酶的酶学常数** 在最适条件下测定马来酸顺反异构酶的最大反应速度  $V_{max}$  和米氏常数  $K_m$ , 采用双倒数作图法 (Lineweaver Burk 法) 作图, 见图 9。根据米氏方程求出马来酸顺反异构酶的  $K_m$  为 4.20 mmol/L, 最大反应速度  $V_{max}$  为 1.27 mmol/(L·min), 进一步计算得到转化数  $k_{cat}$  为 4.38 s<sup>-1</sup>, 酶的催化效率  $k_{cat}/K_m$  为 1.04 L/(mmol·s)。

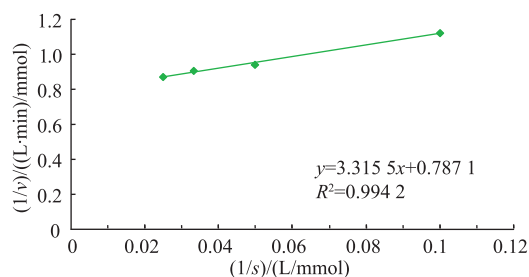


图 9 马来酸顺反异构酶的 Lineweaver Burk 图  
Fig. 9 Lineweaver Burk's plot of MaiA

### 3 结语

迄今为止,已发现了数种能将马来酸转化为富马酸的菌株,但是大部分菌株存在酶催化活力低、稳定性差等问题,无法应用于工业化生产富马酸<sup>[7,9,12]</sup>。*S. marcescens* 来源的马来酸顺反异构酶在室温有较好的稳定性,酶比活力也相对其他菌株来源的要高<sup>[7]</sup>。2000 年,日本三菱化工股份有限公司扩增表达了 *S. marcescens* 来源的马来酸顺反异构酶基因,并测得了该酶的相对分子质量为 28 000<sup>[8]</sup>。然而,其相关酶学性质尚未见报道,而这些数据对于该酶的工业应用有着至关重要的意义。

在 *E. coli* 中表达、纯化得到 *S. marcescens* 来源的马来酸顺反异构的重组酶,其比活力为 48.01 U/mg,比 W. Scher<sup>[12]</sup> 等人报道 *P. putrescens* 来源的马来酸异构酶的比活力 (24.1 U/mg) 高了一倍,显示了其作为工业用酶的优越性。作者首次系统地报道了该酶的酶学性质,表明重组酶最适 pH 为 8.4,与 W. Scher<sup>[12]</sup> 报道的 *P. putrescens* MaiA (最适 pH 是 8.4) 和 *K. Hatakeyama*<sup>[7]</sup> 等人报道的 *A. faecalis* MaiA (最适 pH 是 8.0) 的最适 pH 相似相似。同时发现与 *A. faecalis*<sup>[7]</sup> (在 50 °C 时的半衰期只有 30 min) 相比, *S. marcescens* 来源的重组马来酸顺反异构酶 (在 55 °C 下半衰期约为 1.5 h) 具有更好的热稳定性。值得一提的是,本研究发现马来酸顺反异构酶催化马来酸

生成富马酸的转化率可达 99% 以上, 这项性质有利于获得高纯度的富马酸产物, 显示了该酶在应用于催化富马酸合成应用中具有优越的潜能。本实验研究结果为马来酸顺反异构酶的理论研究及酶法制备马来酸的工业应用提供了理论支持。

同时, 本研究改进了马来酸与富马酸的分离方法<sup>[7,11-12]</sup>, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 使底物马来酸与产物富马酸完全分离, 并可测得其浓度, 提高了马来酸顺反异构酶活力测定的精确性。

## 参考文献:

- [1] Roa Engel C A, Straathof A J J, Zijlmans T W, et al. Fumaric acid production by fermentation [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 78: 379-389.
- [2] 郭世民, 刘志光. 2004 年国内顺酐市场分析[J]. 化工技术经济, 2004, 22(8): 31-34.  
GUO Shimin, LIU Zhiguang. Market analysis of China maleic anhydride in 2004[J]. **Chemical Techno-Economics**, 2004, 22(8): 31-34. (in Chinese)
- [3] 李学坤, 张昆, 高振, 等. 富马酸的合成与应用[J]. 现代化工, 2005, 25: 81-88.  
LI Xuekun, ZHANG Kun, GAO Zhen, et al. Progress in synthesis and application of fumaric acid [J]. **Modern Chemical Industry**, 2005, 25: 81-88. (in Chinese)
- [4] Toshiaki N, Takehiro N, Masaharu M, et al. Bioconversion of maleic acid to fumaric acid by *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1997, 84(2): 165-168.
- [5] Sosaku I, Tomoko I, Seigo S, et al. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2003, 13: 7-13.
- [6] Yasuo K, Jinsaku Y and Yasuhisa A. Maleate *cis-trans* isomerase from *Arthrobacter* sp.TPU 5446 [J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1995, 80(6): 610-612.
- [7] Kazuhisa H, Makotio G, Yasukazi U, et al. Molecular analysis of maleate *cis-trans* isomerase from thermophilic bacteria[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2000, 64(3): 569-576.
- [8] Kazuhisa H, Makotio G, Miki K, et al. Analysis of oxidation sensitivity of maleate *cis-trans* Isomerase from *Serratia marcescens* [J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2000, 64(7): 1477-1485.
- [9] Kazuhisa H, Makotio G, Yasukazi U, et al. Gene cloning and characterization of maleate *cis-trans* isomerase from *Alcaligenes faecalis*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1997, 239: 74-79.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [11] 张国安, 王玉萍, 彭盘英, 等. 反相液相色谱法测定废水中的马来酸和富马酸[J]. 化学世界, 2010, 51(7): 404-407.  
ZHANG Guoan, WANG Yuping, PENG Panying, et al. Determination of fumaric acid and maleic acid in wastewater by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. **Chemical World**, 2010, 51(7): 404-407. (in Chinese)
- [12] Scher W, Jakoby W B. Maleate isomerase[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1969, 244(7): 1878-1882.