

تعیین مقادیر عددی متغیرهای سینتیکی ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم تثبیت یافته گلوکز ایزومراز در محیط آبی-الکلی

فرزانه وهاب زاده* و علی عیوضی**

دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

(دریافت مقاله: ۱۳۷۶/۷/۷ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۷۷/۲/۱۳)

چکیده - کاتالیز ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم تثبیت یافته گلوکز ایزومراز در محیط آبی - الکلی مورد مطالعه قرار گرفته است. با استفاده از رابطه میکلیس - منتن و نیز رابطه هلدین متغیرهای اصلی سینتیکی در این واکنش اندازه گیری و تعیین شده اند: K_{mf} ، V_{mf} ، K_{mr} ، V_{mr} ، مقادیر K_{mf} و K_{mr} برای آنزیم مزبور در محیط الکلی نسبت به این مقادیر در محیط آبی افزایش داشته است اگر چه مقادیر حداکثر سرعت در این رابطه نشانگر کاهش است. این مطلب با استناد به ثابتهای سرعت متناسبه در این واکنش ایزومریزاسیون، مورد تفسیر قرار گرفته است. در بیان پیش بینی ای از این واکنش ایزومریزاسیون، معادله انتگرالگیری شده میکلیس - منتن در موافقت نسبتاً خوبی با نتایج تجربی قرار گرفته است.

Determination of Kinetic Parameters for Catalytic Isomerization of Glucose to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase in an Aqueous-Ethanol Medium

F. Vahabzadeh and A. Aiwazi

Department of Chemical Engineering, Amirkabir University of Technology

ABSTRACT- Catalytic isomerization of glucose to fructose by immobilized glucose isomerase in an aqueous-ethanol medium was studied. Using Michaelis-Menten equation and Haldane relationship, the main kinetic parameters were determined: K_{mf} , V_{mf} , K_{mr} , V_{mr} . By comparing the aqueous-ethanol medium with an aqueous solution, the measured values of K_{mr} and K_{mf} were increased in the aqueous-ethanol solution, while the values for maximal velocities (V_{mf} and V_{mr}) were decreased in this medium. The results from these comparisons were discussed with reference to the rate constants in this isomerization reaction. The integrated form of the Michaelis-Menten equation was used with good approximation to predict the course of the isomerization reaction in the aqueous-ethanol solution.

** فارغ التحصیل کارشناسی ارشد - مهندسی شیمی

* استادیار

E	علامت آنزیم و غلظت آن در یک دانه از کاتالیست	$(m_{g.i.}^3/m_{cat.}^3)$	G_e	غلظت تعادلی گلوکز	R	سرعت واکنش
E_c	غلظت کل آنزیم در یک دانه از کاتالیست	$(m_{g.i.}^3/m_{cat.}^3)$	\bar{G}	غلظت کاهش یافته گلوکز	R_{of}	سرعت اولیه واکنش مستقیم
F	علامت و غلظت فروکتوز	(mol/m^3)	GI	علامت گلوکز ایزومراز	R_{or}	سرعت اولیه واکنش معکوس
F_c	غلظت اولیه فروکتوز	(mol/m^3)	k_p و k_1	ثابت تعادل واکنش	V_{mf} و V_{mr}	حداکثر سرعت واکنشهای مستقیم و معکوس
Fe	غلظت تعادلی فروکتوز	(mol/m^3)	k_p و k_1	ثابت‌های سرعت در معادله واکنش (1)	V'_m	حداکثر سرعت واکنش مستقیم و معکوس
G	علامت و غلظت گلوکز	(mol/m^3)	K_{mf} و K_{mr}	ثابت‌های میکلیس برای واکنشهای مستقیم و معکوس	X	میزان تبدیل نسبی
G_c	غلظت اولیه گلوکز	(mol/m^3)	K'_m	ثابت میکلیس (معادله 11)	XE	واسطه گذاری واکنش و غلظت آن
		(mol/m^3)				$(m_{g.i.}^3-substrate/m_{cat.}^3)$

۱- مقدمه

حلالهای آلی با سطح قطبیت^۳ متفاوت، در سالهای اخیر مورد توجه بسیار است [۴]. در رابطه با تأثیر عوامل مختلف بر واکنش ایزومریزاسیون آنزیمی گلوکز به فروکتوز اگر چه مطالعات تقریباً زیادی انجام گرفته، ولی بررسیهای مبتنی بر مدل‌های سینتیکی در حد نسبتاً محدودی است [۵ و ۶]. جزئیات رفتار سینتیکی آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت یافته (نوع تجارتي) در محیط واکنش "آبی-الکلی" در محل دیگری شرح داده شده است [۷]. در این کار پژوهشی با استفاده از معادله هلدین^۴، مقادیر عددی ثابت‌های سینتیکی میکلیس - متن برای آنزیم تثبیت یافته گلوکز ایزومراز به منظور کاتالیز ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز در محیط آبی - الکلی تعیین و گزارش شده است.

۲- مواد و روش تحقیق

در این تحقیق از آنزیم گلوکز ایزومراز تهیه شده از منبع میکروبی استرپتومایسس میورینس^۵ استفاده شد. در توده‌ای از سلولهای شکست یافته و حاوی مولکولهای آنزیم، تثبیت آنزیم به روش ایجاد پیوندهای عرضی توسط گلو تار آلدهاید به انجام رسیده است. این آنزیم تثبیت یافته محصولی تجارتي از شرکت تولیدی فراورده‌های آنزیمی نوو^۶ بوده و به صورت دانه‌های قهوه‌ای رنگ

استفاده از شربت ذرت غنی شده از فروکتوز^۱ (HFCS) به عنوان جایگزینی مناسب برای سوکرز در شاخه‌های مختلف صنایع غذایی و به خصوص در نوشابه‌سازی از اهمیت صنعتی و تجارتي بالایی برخوردار است [۱]. تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز^۲ نکته اصلی و تعیین کننده در فرایند تولید HFCS به شمار می آید. در واقع شربت گلوکز در طی یک فرایند آنزیمی از نشاسته ذرت حاصل می شود، تحت عملکرد آنزیم GI به شربتی حاوی مخلوط تقریباً هم مولار از گلوکز و فروکتوز تبدیل می شود [۲]. میزان تبدیل تعادلی در این واکنش، اندکی پایینتر از حد مطلوب و مورد نظر (برای تهیه و تولید شربتی برخوردار از شیرینی یکسان با سوکرز) بوده است و به منظور بررسی امکان تغییر ثابت تعادل در راستای تولید و تشکیل بیشتر فروکتوز، تغییر محیط واکنش (حلال) مدنظر قرار گرفته است و با توجه به خوراکی بودن شربت مزبور و نیز به دلایل میزان محلول بودن واکنشگرها و امتزاج پذیری با آب و مسائل هزینه‌ای، در حال حاضر عمدتاً توجه به استفاده از اتانل معطوف شده است [۳]. از سوی دیگر مطالعه و بررسی عملکرد کاتالیتیکی آنزیمها در محیطهایی نه کاملاً آبی و یا به عبارتی در



با توجه به فرض برقراری روش حالت پایا، سرعت واکنش ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز (واکنش مستقیم) را می توان به صورت زیر ارائه کرد:

$$R = \frac{(k_1 k_2 G - k_{-1} k_{-2} F) E_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 G + k_{-2} F} \quad (2)$$

حداکثر سرعت و نیز ثابت میکلیس برای واکنش گلوکز به فروکتوز (واکنش مستقیم) به ترتیب با K_{mf} و V_{mf} مشخص می شوند و حداکثر سرعت و نیز متغیر K_m برای واکنش برگشتی (واکنش معکوس) به ترتیب با K_{mr} و V_{mr} مشخص شده اند. مجدداً اینکه با در نظر گرفتن فرضیات اصلی در ارائه مدل آنزیمی میکلیس می توان متغیرهای سینتیکی را به شرح زیر تعریف کرد:

$$V_{mf} = k_2 E_0 \quad (3)$$

$$V_{mr} = k_{-1} E_0 \quad (4)$$

$$K_{mf} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5)$$

$$K_{mr} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (6)$$

ثابت تعادل بر مبنای ثابتهای شدت به صورت زیر ارائه می شود:

$$K = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} \quad (7)$$

پس از جابه جاییهای لازم می توان معادله هلدین را به صورت زیر ارائه کرد:

$$K = \frac{Fe}{Ge} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{V_{mf} K_{mr}}{V_{mr} K_{mf}} \quad (8)$$

با در نظر گرفتن دو معادله زیر:

استوانه ای شکل با توزیع اندازه ذرات بین ۰/۳ تا ۱ میلی متر است. فعالیت اولیه آنزیم در حد 350 IGIU/g بیان شده است [۸]. کلیه مواد به کار برده شده از قبیل گلوکز، فروکتوز، MgSO_4 و VH_4O ، CoCl_2 و $\text{6H}_2\text{O}$ ، اتانل و سایر نمکها و اسیدها و بازها از حد خلوص بالایی برخوردار بوده اند. محیطهای واکنش حاوی نسبت مشخصی از آب و اتانل (به عنوان حلال)، گلوکز یا فروکتوز (به عنوان سوبسترا) و یونهای کبالت و منیزیم (فعالسازی آنزیم) بوده و برای انجام واکنش ایزومریزاسیون از یک راکتور شیشه ای سه دهانه مجهز به همزن دقیق و سیستم کنترل و تنظیم دما و pH استفاده شد. واکنش به صورت ناپیوسته مورد مطالعه قرار گرفت. به نمونه های گرفته شده از محیط واکنش، برای اطمینان از توقف کامل واکنش ایزومریزاسیون آنزیمی، ۲ میلی لیتر پرکلریک اسید ۱٪ اضافه شد و اندازه گیری غلظت فروکتوز موجود در نمونه (ها) با استفاده از روش طیف سنجی نوری در طول موج مرئی 562 mm صورت گرفت [۹]. این روش در برگیرنده ترکیبات سیستین هیدروکلراید و کاربازول بوده و بر مبنای واکنش کتوکتوزها، کتوپنتوزها، تری اوزها و گلیکولیک آلدئیدها با کاربازول در سولفوریک اسید قرار دارد. چنانچه غلظت گلوکز در نمونه های کمتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر باشد، در سنجش صحیح غلظت فروکتوز تأثیر و تداخلی حاصل نخواهد شد.

با استفاده از مدل سینتیکی میکلیس - منتن و نیز معادله هلدین و به کمک ترسیم معکوس دو جهتی لاین و یور-بارک^۷ متغیرهای اصلی سینتیکی در این واکنش ایزومریزاسیون آنزیمی اندازه گیری و تعیین شده است.

۳- نتایج و تفسیر

متغیرهای سینتیکی K_m و V_m در معادله معمول و متداول میکلیس - منتن بر مبنای تعدادی از ثابتهای شدت بیان و تعریف شده است و از آنجا که در تعیین ثابت تعادل نیز از همان ثابتها استفاده می شود لذا میان ثابت تعادل و متغیرهای سینتیکی K_m و V_m می توان ارتباطی برقرار کرد [۱۰ و ۱۱]. این ارتباط تحت عنوان معادله هلدین نام گرفته است. در این ارتباط واکنش ساده دو مرحله ای برگشت پذیر زیر در نظر گرفته می شود:

جدول ۱- ثابتهای میکلیس - منتن و حداکثر سرعتهای واکنش برای واکنش ایزومریزاسیون

کمیت	محیط واکنش آبی	محیط واکنش حاوی ۵۰٪ اتانل
K_{mf} (mol/m ³)	۲۵۰	۳۷۰
V_{mf} (mol/m ³ .sec)	۰/۰۴۹	۰/۰۳۱
K_{mr} (mol/m ³)	۴۴۰	۶۴۰
V_{mr} (mol/m ³ .sec)	۰/۰۸۷	۰/۰۴۴

$$\frac{1}{R_{.f}} = \frac{K_{mf}}{V_{mf}} \cdot \frac{1}{G_0} + \frac{1}{V_{mf}} \quad (15)$$

$$G + F = G_0 + F_0 = (K + 1) G_e \quad (9)$$

$$\bar{G} = G - G_e \quad (10)$$

و نیز ترسیم نتایج می توان مقادیر K_{mf} ، V_{mf} ، K_{mr} ، V_{mr} را تعیین کرد. در واکنش ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز غلظتهای اولیه گلوکز برابر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و mol/m^3 ۲۵۰ بوده و در واکنش معکوس نیز از همین غلظتهای فروکتوز استفاده شده است. دمای واکنش $50^\circ C$ و pH (تنظیم شده با بافر $NaOH - KH_2PO_4$) برابر ۷/۵ در نظر گرفته شد. غلظت یونهای منیزیم و کبالت به ترتیب برابر $0.5 mol/m^3$ و $1 mol/m^3$ ، مقدار آنزیم $50 kg/m^3$ و حجم کل محلول در محیط واکنش برابر $3 \times 10^{-4} m^3$ بوده است. دور همزن $300 rpm$ و زمان واکنش نیز ۶۰۰ ثانیه منظور شده است. در ادامه مطلب به جدول (۱) و نیز شکل‌های (۱) و (۲) توجه کنید. با در نظر گرفتن مقادیر موجود در جدول (۱) و به کمک معادله‌های (۳) تا (۶)، تک تک ثوابت سرعت واکنش ایزومریزاسیون قابل محاسبه‌اند، جدول (۲). به علاوه با استفاده از معادله (۷) مقدار ثابت تعادل واکنش در دمای $50^\circ C$ در محیط آبی برابر ۰/۹۹ و در محیط حاوی ۵۰٪ اتانل برابر ۱/۲۳ محاسبه می‌شود. آزمایشاتی که مستقیماً برای تعیین موقعیت تعادلی واکنش انجام گرفته است. مقدار K را در محیط آبی برابر ۱/۰۴ و در محیط ۵۰٪ الکی برابر ۱/۱۶ معرفی می‌کند. با توجه به مراجع دیگر مقدار عددی ثابت تعادل در محیط آبی و در دمای $50^\circ C$ برابر $1/03$ ، $1/093$ و $1/0$ [۱۲ و ۱۳] تعیین و گزارش شده است.

در آزمایشات تعیین مسیر پیشرفت واکنش با زمان، میزان تبدیل حاصله برای واکنشهای مستقیم و معکوس در محیطهای آبی و ۵۰٪ الکی تا نزدیک نقطه تعادل دنبال شد. نتایج ارائه شده در

و اینکه \bar{G} عبارت از غلظتی از سوبسترای گلوکز است که با نزدیک شدن واکنش به موقعیت تعادلی، به سمت صفر میل می‌کند. با به کار گرفتن معادله‌های (۸) و (۹) و (۱۰) و جایگذاری آنها در معادله (۲) می‌توان معادله زیر را که در واقع شباهت کاملی با معادله معمول میکلیس - منتن دارد به دست آورد:

$$R = -\frac{d\bar{G}}{dt} = \frac{V_m \bar{G}}{K_m + \bar{G}} \quad (11)$$

با توجه به معادله بالا، دو متغیر V_m' ، K_m' به صورت زیر تعریف می‌شوند [۱۱].

$$V_m' = \left(\frac{K+1}{K}\right) \left(\frac{K_{mr}}{K_{mr}-K_{mf}}\right) V_{mf} \quad (12)$$

$$K_m' = \left(\frac{1}{K_{mr}-K_{mf}}\right) [(K_{mr}+K_{mf} K) G_e + K_{mr} K_{mf}] \quad (13)$$

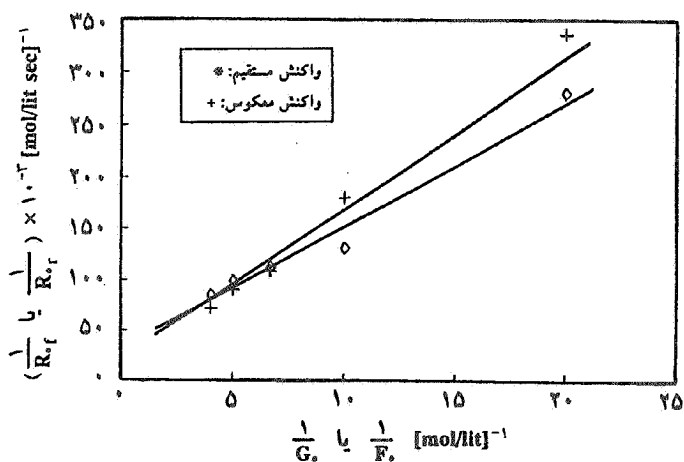
با در نظر گرفتن فرضیات معمول در کسب معادله میکلیس - منتن، می‌توان معادله زیر را برای واکنش ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز ارائه کرد.

$$R_{.f} = \frac{V_{mf} G_0}{G_0 + K_{mf}} \quad (14)$$

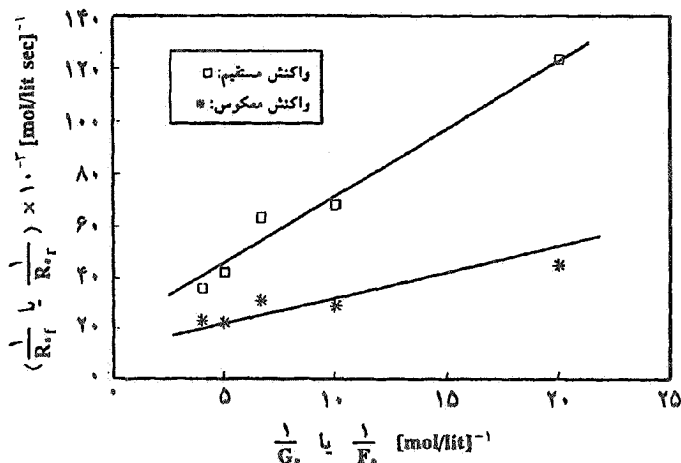
البته برای واکنش معکوس ایزومریزاسیون بالا (فروکتوز به گلوکز) نیز می‌توان معادله مشابهی تعریف و ارائه کرد. با استفاده از معادله خطی معکوس دو جهتی لاین - ویوربارک:

جدول ۲- ثابتهای سرعت واکنش ایزومریزاسیون (در دمای ۵۰°C)

$k_2 E_0$ (mol/m ³ .sec)	$k_{-1} E_0$ (mol/m ³ .sec)	$k_{-2} E_0$ (1/sec)	$k_1 E_0$ (1/sec)	
۰/۰۴۹	۰/۰۸۷	$3/1 \times 10^{-4}$	$5/44 \times 10^{-4}$	محیط واکنش کاملاً آبی
۰/۰۳۱	۰/۰۴۴	$1/17 \times 10^{-4}$	$2/0.3 \times 10^{-4}$	محیط حاوی ۰/۵٪ وزنی اتانل



شکل ۲- ترسیمهای «لاین ویور - بارک» برای واکنشهای مستقیم و معکوس در محیط ۰/۵٪ الکلی



شکل ۱- ترسیمهای «لاین ویور - بارک» برای واکنشهای مستقیم و معکوس در محیط آبی

به علت پایین بودن میزان حل شدن این مواد در محیط واکنش حاوی اتانل غلظت سوپسترا و یونهای فعالساز آنزیم کمتر از مقادیر معمول و متعارف خود است [۱۴].

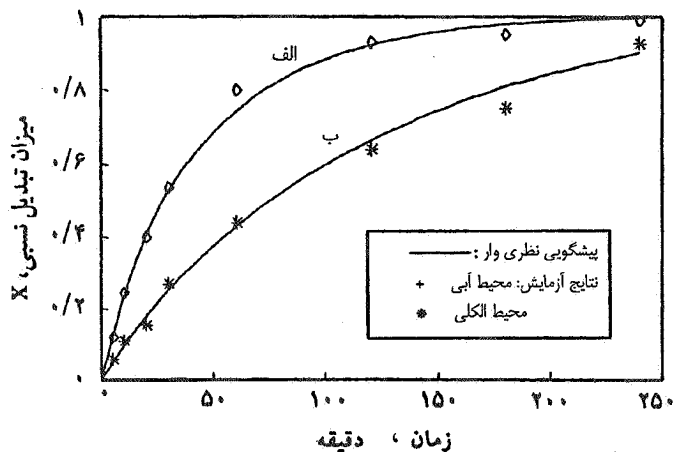
با انتگرالگیری از معادله (۱۱) می توان از میزان تبدیل نسبی و نیز زمان در این واکنش، تخمینی را به دست آورد:

$$t = \frac{\bar{G}_0}{V'_m} X - \frac{K'_m}{V'_m} \ln(1-X) \quad (16)$$

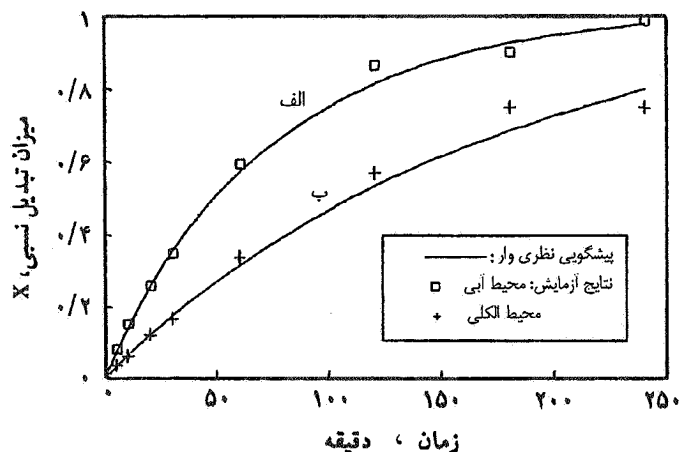
$$X = \frac{G_0 - G}{G_0 - G_e}$$

با استفاده از نتایج تجربی و نیز با به کارگیری معادله بالا در امر ارائه پیش بینی ای بر زمان تبدیل، شکل‌های (۳) و (۴) تهیه شده‌اند. نتایج حاصل از مطالعه پیشرفت واکنش با زمان نشانگر آن است که داده‌های تجربی به دست آمده برای میزان تبدیل در این واکنش

جدول (۱) حاکی از کاهش حداکثر سرعت واکنش (V_{mf} و V_{mr}) و افزایش ثابت میکلیس - متن (K_{mf} و K_{mr}) در محیط الکلی نسبت به محیط آبی است. آزمایشات انجام شده نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم گلوکز ایزومراز در محیط واکنش حاوی اتانل کمتر از محیط کاملاً آبی بوده و میزان کاهش فعالیت به غلظت الکل موجود بستگی دارد [۷]. با تکیه بر این مطلب، کاهش حداکثر سرعت واکنشهای مستقیم و معکوس که طبق تعریف به کار برده شده متناسب با k_2 و k_1 هستند به عنوان نمود دیگری از این پدیده توجیه می‌شود. در این آزمایشات، غلظت اولیه سوپسترا برابر 150 mol/m^3 بوده است. به علت تجزیه فروکتوز و گلوکز در pHهای بالا، مقدار pH محیط واکنش اندکی پایینتر از مرحله قبل و برابر $7/3$ در نظر گرفته شده است. مقدار آنزیم نیز 70 kg/m^3 و دور همزن برابر 250 rpm بوده است. از فعالسازهای آنزیم GI نیز در همان غلظتهای مورد اشاره در قبل استفاده شد. لازم به ذکر است که



شکل ۴- میزان تبدیل نسبی برحسب زمان برای واکنش معکوس در دمای ۵۰° (الف) محیط واکنش آبی، (ب) محیط واکنش حاوی ۵۰٪ وزنی اتانل



شکل ۳- میزان تبدیل نسبی برحسب زمان برای واکنش مستقیم در دمای ۵۰° (الف) محیط واکنش آبی، (ب) محیط واکنش حاوی ۵۰٪ وزنی اتانل

ایزومریزاسیون گلوکز به فروکتوز در محیط آبی - الکی می توان از مدل پیشنهادی و معادله میکلیس و نیز معادله هلدین استفاده کرد و به این ترتیب تعیین مقادیر عددی متغیرهای سینتیکی اصلی در واکنشهای مستقیم و معکوس امکانپذیر خواهد بود. در تعیین مسیر پیشرفت واکنش با زمان، نتایج تجربی حاصل به امکان به کارگیری شکل انتگرالگیری شده معادله میکلیس اشاره دارد.

ایزومریزاسیون آنزیمی بر مسیر پیش بینی شده توسط معادله میکلیس به شکل انتگرالگیری شده آن، به صورت مناسبی منطبق است و در محیط واکنشی آبی و نیز آبی - الکی میزان این انطباق از موقعیت تقریباً مشابهی برخوردار است.

۴- نتیجه گیری

در بیان رفتار سینتیکی آنزیم تثبیت یافته گلوکز ایزومراز در

واژه نامه

- | | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1. high-fructose corn syrup | 4. Haldane equation | 7. Lineweaver-Burk plots |
| 2. glucose isomerase | 5. streptomyces murinus | |
| 3. polarity | 6. Novo | |

مراجع

1. Pszczola, D.E., "American Fructose Unveils new Technologies in HFCS Plant, "Food Technology, 41(10): 50, 1987.
2. Hagen, H. A., and Pedersen, S., *Enzymes*, pp. 341-350 (Vol. A9), in Yamamoto, Y.S., Kaudy, L., Rounsaville, F., and Schulz, G. (eds), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, Germany, 1989.
3. Visuri, K., Klibanov, A. M., "Enzymatic Production of High Fructose Corn Syrup (HFCS) Containing 55% Fructose in Aqueous Ethanol, "Biotechnol. Bioeng., 30:917, 1987.
4. Zaks, A., and Klibanov, A. M., "Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents," *J. Biol. Chem.*, 263: 3194, 1988.
5. Brown, S. H., Sjöholm, C., and Kelly, R. M., "Purification and Characterization of a Highly Thermostable Glucose Isomerase Produced by the Extremely Thermophilic Eubacterium, *Thermotoga Maritima*," *Biotechnol. Bioeng.*, 41:878, 1993.

6. Volking, D. B., and Klivanov, A. M., "Mechanism of Thermoinactivation of Immobilized Glucose Isomerase," *Biotechnol Bioeng.*, 33: 1104, 1989.
- ۷- عیوضی، ع.، "بررسی رفتار سنتیکی آنزیم گلوکز در محیط آبی - الکلی در راکتور ناپیوسته"، پایان نامه کارشناسی ارشد در مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر (پلی تکنیک تهران)، اسفند ۱۳۷۵
8. Sweetzyme T (B395c-GB 3000, Feb. 1991), Novo Nordisk A/S Denmark.
9. Ryu, D. Y., Chung, S. H., and Katoh, K., "Performance of the Continuous Glucose Isomerase Reactor System for the Production of Fructose Syrup," *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 159, 1977.
10. Sproull, R. D., Lim, H. C., and Schneider, D. R., "A Model for Enzymatic Isomerization of D-Glucose to D-Fructose in a Batch Reactor," *Biotechnol. Bioeng.*, 18: 633, 1976.
11. Dixon M., and Webb, E. C., *Enzymes*, 3rd. ed., Academic Press, 1979.
12. Kikkert, A., Vellenga, K., De Wilt, H. G. J., and Joosten, G. E. H., "The Isomerization of D-Glucose into D-Fructose Catalyzed by Whole-Cell Immobilized Glucose Isomerase. The Dependence of the Intrinsic Rate of Reaction on Substrate Concentration, pH and Temperature," *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 1087, 1981.
13. Lee, Y. Y., Fratzke, A. R., Wun, K., and Tsao, G. T., Glucose Isomerase Immobilized on porous Glass," *Biotechnol. Bioeng.*, 18: 389, 1976.
14. Zaks. A., and Klivanov, A. M., The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media," *J. Biol. Chem.*, 263: 8017, 1988.