หลักการและสภาวการณ์ปัจจุบันของการสังเคราะห์เพปไทด์

Principles and Current Status of Peptide Synthesis

จิตติมา เจริญพานิช*
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Jittima Charoenpanich*
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

บทคัดย่อ

บทความนี้นำเสนอสามหลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์เพปไทด์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญอย่างมากในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเครื่องสำอาง การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีเป็นวิธีที่มีศักยภาพเนื่องจากได้ปริมาณผลผลิตสูง แต่มีข้อจำกัดในการใช้สารเคมีอันตรายและความเสี่ยงในการเกิดปฏิกิริยาเรสไมเซชั่นระหว่างกระบวนการผลิต วิธีที่สองคือการใช้เอนไซม์โปรติเอสในการผลิตเพปไทด์ผ่านวิธีการสังเคราะห์ด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาเคมี ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะของโครงสร้างสเตอริโอ แต่ทำให้เกิดการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เนื่องจากการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่ปราศจากน้ำ เช่น ในตัวทำละลายอินทรีย์ ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการทำวิศวกรรมสารตัวกลาง วิศวกรรมตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือวิศวกรรมสับสเตรท วิธีที่สามเป็นการใช้เอนไซม์เพปไทด์ซินทิเทส หรือ อะมิโนเอซิดไลเกสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เพปไทด์ ที่มีข้อได้เปรียบเหนือวิธีอื่นในเรื่องของต้นทุนการผลิต และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : การสังเคราะห์เพปไทด์ โปรติเอส เพปไทด์ซินทิเทส อะมิโนเอซิดไลเกส

Abstract

Peptide is a biologically active molecule of paramount importance in the fields of health care, cosmetic and nutrition. Nowadays, there are many techniques used to industrially synthesize the peptide compound. Among all, three methods were selected to summarize in this review. Chemical synthesis is a potential and limitation method for peptide production due to high yield production, however requires many harmful reagents for reactions and a risk of racemization during process. Peptide-bond-hydrolyzing enzymes, such as proteases are required for the production of peptide via a chemoenzymatic method that gives a stereospecific product. However, a non-aqueous condition such as that in an organic solvent might cause the loss of enzyme activity. This problem should be solved by an engineering of either medium, biocatalyst, or substrate. The third method is an enzymatic synthesis by the potential action of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) or L-amino acid α-ligase (Lal). This method has advantages because the enzyme used is likely the most cost-efficient and environmentally friendly.

Keywords : peptide synthesis, protease, peptide synthetase, amino acid ligase

*E-mail : jittima@buu.ac.th

บทนำ

ค่านิยมในการใส่ใจสุขภาพของมนุษย์ ส่งผลให้ตลาดการผลิตอาหารสุขภาพได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น หนึ่งในอาหารเสริมสุขภาพที่มีกำลังการผลิตและการแข่งขันสูงในปัจจุบันได้แก่ เครื่องดื่มผสมกรดอะมิโน หรือโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) ที่รับรองว่ามีเพปไทด์ที่พร้อมจะดูดซึมและให้สมองนำไปใช้งานได้ทันที นอกจากนี้ความสนใจในการดูแลรักษารูปร่าง ยังส่งผลต่อกำลังการผลิตรวมทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มในชีวิตประจำวันให้ปราศจากน้ำตาลหรือพลังงาน (แคลอรี; calorie) แต่ยังคงรสชาติของความหวานไว้เช่นเดิมจากการเติมสารให้ความหวานเทียมในรูปของไดเพปไทด์เพิ่มขึ้นด้วย จากคำโฆษณาชวนเชื่อดังกล่าวกระตุ้นให้เกิดคำถามของผู้บริโภคถึงที่มาของสินค้าดังกล่าว รวมทั้งกระบวนการอันได้มาซึ่งสารคุณประโยชน์ที่ชื่อว่า “เพปไทด์ (peptide)” นั้น

เพปไทด์ เป็นโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biologically active molecule) ที่มีความสำคัญและถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายไม่เฉพาะแค่เพียงในอุตสาหกรรมอาหารสุขภาพ แต่ยังครอบคลุมไปถึงทางเภสัชกรรม และทางการเกษตร (Berson & Yalow, 1973; Guinn *et al*., 1995; Sergeeva *et al*., 1997; Yagasaki & Hashimoto, 2008) ตัวอย่างของเพปไทด์ที่รู้จักคุ้นเคยกันดี ได้แก่ อินซูลิน (insulin) ซึ่งเป็นเพปไทด์ขนาดกลางที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 หน่วย (residue) ที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน หรือน้ำตาลเทียมแอสปาแทม (aspartame) ที่มักพบเป็นส่วนผสมหลักในอาหารที่มีรสชาติหวานแต่ไม่ให้พลังงานเหมือนน้ำตาล

นิยามของคำว่าเพปไทด์ในทางชีวเคมีนั้นหมายถึงสารประกอบเฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) หลายหน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่แอลฟาอะมิโน (α-amino group) ของกรดอะมิโนตัวถัดไป โดยทั่วไปสารประกอบของกรดอะมิโนที่จะจัดเป็นเพปไทด์ได้นั้นต้องเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 6000 ดอลตัน (dalton) หากสารประกอบของกรดอะมิโนมีน้ำหนักโมเลกุลเกินกว่านี้จะจัดเป็นโปรตีน (protein)

หน้าที่ของเพปไทด์ โดยเฉพาะไดเพปไทด์ (dipeptide) ที่สำคัญและทำให้ได้รับความนิยมในการผลิต มีอยู่สองหน้าที่ คือ หน้าที่หลักของเพปไทด์นั้นเอง เช่น สารให้ความหวานแอสปาแตมที่เกิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมกรดอะมิโนแอสปาติกเอซิด (aspartic acid) เข้ากับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ถูกเอสเทอริไฟล์ (esterified phenylalanine) ส่งผลให้เกิดรสหวาน และหน้าที่ในการเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) ของกรดอะมิโนที่ทำให้คุณสมบัติของกรดอะมิโนนั้นเปลี่ยนไป เหมาะกับวัตถุประสงค์การใช้ที่หลากหลายมากขึ้น เช่น กรดอะมิโนแอล-กลูตามีน (L-glutamine) โดยทั่วไปจะระเหยได้เมื่อถูกความร้อนแต่หากอยู่ในรูปของไดเพปไทด์แอล-อะลานิล-แอล-กลูตามีน (L-alanyl-L-glutamine; Ala-Gln) แล้วจะทนต่ออุณหภูมิได้สูงขึ้น หรือตัวอย่างของกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ที่โดยทั่วไปไม่สามารถละลายได้ในน้ำแต่หากอยู่ในรูปของไดเพปไทด์อะลานีน-ไทโรซีน (Ala-Tyr) จะสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น เป็นต้น (Yagasaki & Hashimoto, 2008) ตัวอย่างของไดเพปไทด์ที่ถูกนำมาใช้ทางการค้าในปัจจุบันแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างไดเพปไทด์ที่มีขายทางการค้าและหน้าที่

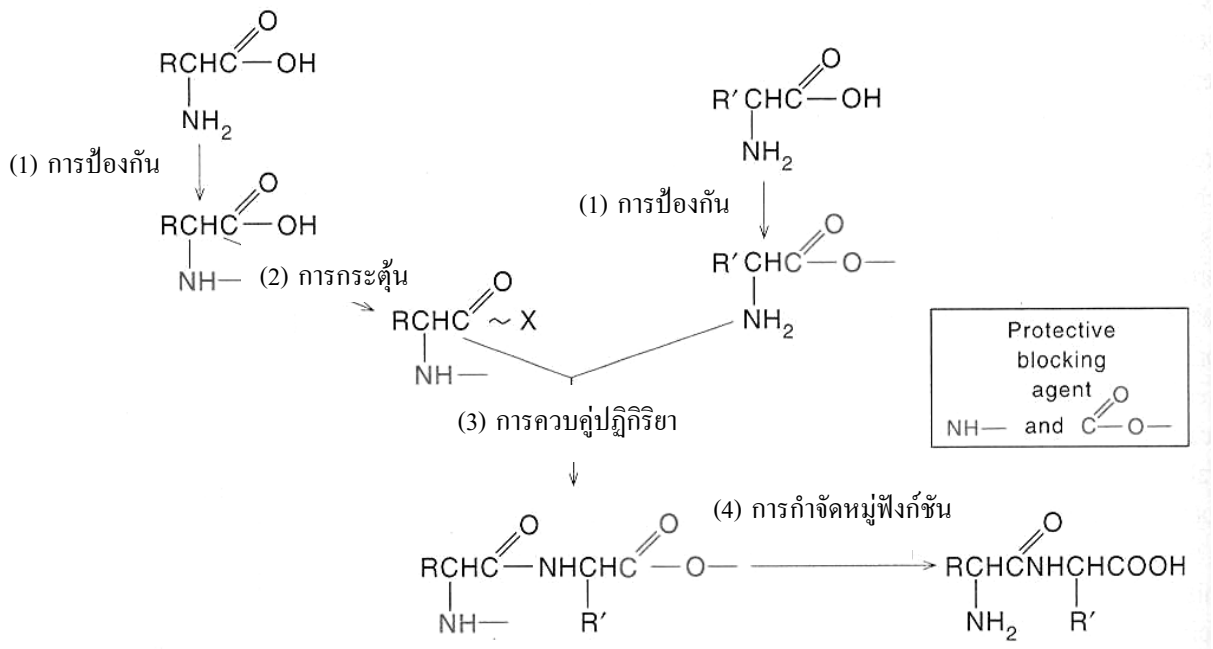
สารองค์ประกอบ	การใช้งาน	รูปที่มีขายทางการค้า
Aspartame	สารให้ความหวาน	สารบริสุทธิ์
Ala-Gln	ยาฉีด	สารบริสุทธิ์
Gly-Tyr	ยาฉีด	สารบริสุทธิ์
Carnosine	เครื่องดื่มเสริมกำลัง, เกลือแร่	สารผสม, สารบริสุทธิ์
N-Acetyl carnosine	สารต้านริ้วรอย	สารบริสุทธิ์
Val-Tyr	อาหารสุขภาพ	สารผสม

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yagasaki & Hashimoto, 2008

ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีการสังเคราะห์เพปไทด์หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการสกัดโดยตรงจากแหล่งธรรมชาติ (Hipkiss & Brownson, 2000) การผลิตโดยเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะกับการสังเคราะห์เพปไทด์ขนาดใหญ่ เช่น อินซูลิน หรือ ฮอร์โมนอื่นๆ (Gill *et al.,* 1996; Walsh, 2005) การผลิตในระบบเอื้อการแสดงออกที่ปราศจากเซลล์ (cell-free expression system) (Katzen *et al.,* 2005) การผลิตโดยใช้พืชและสัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีน (transgenic animal/plant) (Cunningham & Porter, 1997; Wright *et al.,* 1991) การผลิตโดยการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ที่เหมาะกับเพปไทด์ขนาดเล็กถึงปานกลาง (ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 5 ถึง 80 หน่วย) (Du Vigneaud *et al.,* 1953; Kimmerlin & Seebach, 2005) หรือ การใช้เทคโนโลยีเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) ภายใต้สภาวะของสมดุลปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสร้างพันธะเพปไทด์ (Feli *et al.,* 1995; Guzmn *et al.,* 2007) ซึ่งเหมาะกับการผลิตเพปไทด์ที่มีสายกรดอะมิโนต่ำกว่า 10 หน่วย เช่น ไดเพปไทด์ หรือ ไทรเพปไทด์ (tripeptide) (Kumar & Bhalla, 2005) โดยวิธีการผลิตสองวิธีหลังนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากในอุตสาหกรรมการผลิตเพปไทด์ปัจจุบันและเป็นวิธีที่ผู้เขียนจะขอกล่าวถึงหลักการโดยสรุปของการผลิตเพปไทด์ด้วยวิธีดังกล่าวไว้ในบทความฉบับนี้

การสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมี (Chemical synthesis)

นิยมใช้ในการผลิตเปปไทด์ที่มีขนาดในช่วงระหว่าง 5 ถึง 80 หน่วย ซึ่งมักเป็นเพปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญทางเภสัชกรรม เช่น อินซูลิน ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 51 หน่วย หรือใช้ในการผลิตเพปไทด์เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเพปไทด์หรือโปรตีนนั้น รวมทั้งใช้ในการผลิตวัคซีน ยา หรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางการแพทย์ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีนี้มีข้อเสียในเรื่องของความจำเพาะในการคัดเลือกสับสเตรทมาทำปฏิกิริยาที่ต่ำและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีนั้นประกอบด้วยขั้นตอนพื้นฐาน 4 ประการที่สำคัญ (ภาพที่ 1) ได้แก่



ภาพที่ 1 ขั้นตอนพื้นฐานที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี
ที่มา: ดัดแปลงจาก Zubay, 1998

ขั้นที่ 1 การป้องกัน (protect) หมู่ฟังก์ชัน (functional group) อื่นที่ไม่ใช่หมู่ฟังก์ชันที่ใช้ในการสร้างพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน โดยส่วนใหญ่มักเป็นหมู่ฟังก์ชันของสายโซ่ข้าง (side chain) ในกรดอะมิโนสับสเตรทนั้น เช่น หมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) ของกรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine) หรือหมู่อะมิโนในสายโซ่ข้างของกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) เป็นต้น

ขั้นที่ 2 การกระตุ้น (activate) หมู่คาร์บอกซิลอิสระของกรดอะมิโนที่ถูกป้องกัน (protected amino acid) โดยทั่วไปมักใช้สารเคมีในรูปของเกลือ เช่น เกลือยูโรเนี่ยม (uronium salt) หรือเกลือฟอสโฟเนี่ยม (phosphonium salt) และไฮดรอกซีเบนโซไตรอะโซน (hydroxybenzotriazole) ในการกระตุ้น เนื่องจากมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูง และให้ผลผลิตที่มีความจำเพาะและปริมาณสูง

ขั้นที่ 3 การควบคู่ (coupling) ปฏิกิริยาของกรดอะมิโนที่ถูกกระตุ้น (activated amino acid) กับกรดอะมิโนที่ถูกป้องกัน มักใช้เกลือชาร์โทรปิก (chaotropic salt) เช่น CuLi, $NaClO_4$, KSCN และสารผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น dimethylformamide, trifluoroethanol และ dimethylacetamide เพิ่มประสิทธิภาพในการควบคู่ปฏิกิริยาและการต่อสายเพปไทด์ให้ดีขึ้น

ขั้นที่ 4 การกำจัด (unblock) หมู่ฟังก์ชันที่ถูกป้องกันทั้งหมดของไดเพปไทด์ โดยทั่วไปจะใช้สารละลายกรดเข้มข้น หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมกรด เป็นสารกำจัดหมู่ฟังก์ชัน ที่นิยมใช้ได้แก่ สารผสมของ HBr กับ trifluoroacetic acid หรือสารละลายผสมของ triisopropylsilane กับ trifluoroacetic acid เป็นต้น

ข้อได้เปรียบของการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี คือ สามารถใช้สังเคราะห์ไดเพปไทด์ได้ทุกชนิดเมื่อเลือกหมู่ฟังก์ชันและสารเคมีกระตุ้นที่เหมาะสมและให้ปริมาณผลผลิตในการสังเคราะห์ (yield) ไดเพปไทด์ที่สูง รวมทั้งสามารถทำการสังเคราะห์ได้ในระดับเล็ก (small scale) อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ไดเพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีนั้น มีข้อเสียในเรื่องของต้นทุนในการสังเคราะห์ที่สูงเนื่องจากมีการใช้สารเคมีที่จำเพาะและต้องทำในหลายขั้นตอน รวมทั้งมีโอกาสสูงที่จะเกิดปฏิกิริยาเรสไมเซชั่น (racemization) ซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีไอโซเมอร์ (isomer) ต่างไประหว่างการสังเคราะห์ได้ และในบางครั้งมีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายในการสังเคราะห์อีกด้วย จากข้อดีและข้อเสียเหล่านี้ทำให้ปฏิกิริยาเคมีเหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์ที่เป็นสารเคมีที่ใช้สำหรับห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งนิยมผลิตในปริมาณสูงและสามารถแยกไอโซเมอร์ที่จำเพาะต่อการใช้งานได้ (Guzmn *et al.,* 2007; Yagasaki & Hashimoto, 2008)

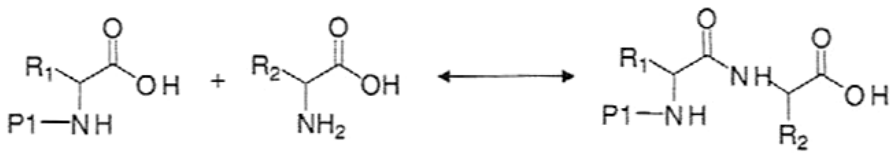
ในปัจจุบันการสังเคราะห์เพปไทด์หากเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงไม่กี่หน่วยนั้น นิยมทำการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมีในรูปของสารละลายมากกว่าการสังเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ตัวยึดของแข็ง (solid support column) ข้อดีของการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธีนี้คือสามารถแยกและทำบริสุทธิ์สารตัวกลาง ซึ่งอาจเป็นผลิตภัณฑ์เพปไทด์ออกมาได้ในแต่ละขั้นตอน โดยไม่รบกวนปฏิกิริยาการต่อสายเพปไทด์ในระบบที่จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องต่อไป รวมทั้งยังสามารถออกแบบขนาดของเพปไทด์ที่ต้องการได้จากการเลือกหมู่ฟังก์ชันที่จะทำการป้องกัน และยังสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ขนาดใหญ่ได้โดยการควบคู่ปฏิกิริยาของเพปไทด์สายสั้นที่เกิดจากการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นเข้าไว้ด้วยกัน (Guzmn *et al*., 2007)

การสังเคราะห์ด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาเคมี (Chemoenzymatic synthesis)

เอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะเพปไทด์โดยปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) เช่น เอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาการสลาย เช่น ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนสองชนิดในสภาวะที่ปราศจากน้ำ คือ ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) หรือในสภาวะของไหลซุปเปอร์คริติคอล (supercritical fluid) ได้ การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาเคมีนั้น เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างสูงในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ผสมข้อดีและข้อเสียของวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ทั้งสองเข้าไว้ด้วยกัน (Hou *et al*., 2005) เช่น คุณสมบัติในการคัดเลือกโครงสร้างอิแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) ที่มีความจำเพาะและสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงของเอนไซม์ และยังคงต้องการสารเคมีที่เหมาะสมในการเพิ่มความจำเพาะสำหรับการทำปฏิกิริยาของกรดอะมิโนสับสเตรท ด้วยการป้องกันหมู่ฟังก์ชันที่ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ในกรดอะมิโนสับสเตรทตัวใดตัวหนึ่ง เป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตในการสังเคราะห์ที่สูงขึ้น เป็นต้น กลไกที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์ มี 2 กลไกหลัก ได้แก่

1. ***กระบวนการสังเคราะห์แบบควบคุมสมดุล (equilibrium-controlled process)*** หรือบางครั้งเรียกว่ากระบวนการสังเคราะห์แบบควบคุมเทอร์โมไดนามิก (thermodynamically

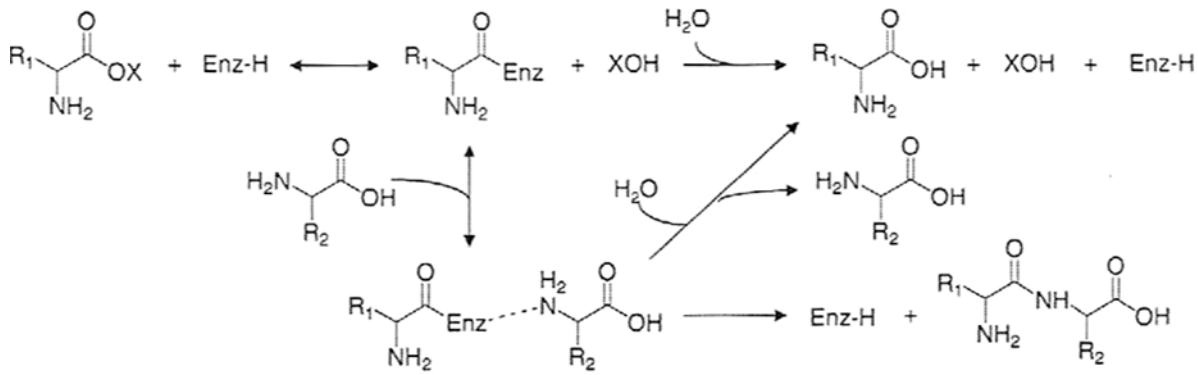
controlled) เป็นการสังเคราะห์เพปไทด์โดยอาศัยพื้นฐานความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์โปรติเอสหรือเอนไซม์เอสเทอเรส แสดงดังภาพที่ 2 คำว่าการสังเคราะห์แบบควบคุมสมดุลนั้น หมายถึงการรักษาสมดุลของปฏิกิริยาระหว่างการเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำที่ให้กรดอะมิโนอิสระ กับปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์จากกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นนั้นและเมื่อผลิตภัณฑ์ไดเพปไทด์ที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำกว่าสับสเตรทกรดอะมิโนอิสระแล้วก็สามารถแยกไดเพปไทด์ที่เกิดขึ้นออกมาได้จากปฏิกิริยาสมดุลดังกล่าว ทำให้ปริมาณของไดเพปไทด์ในระบบปฏิกิริยาเกิดความไม่สมดุล ส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาให้เป็นไปในทิศทางของการสังเคราะห์ไดเพปไทด์เพิ่มมากขึ้น ในบางครั้งอาจใช้การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่ส่งผลต่อสมดุลการแตกตัวของกรดอะมิโนอิสระ การถ่ายผลิตภัณฑ์ไดเพปไทด์ที่เกิดขึ้นออกจากสมดุลระบบโดยการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แยกชั้นจากชั้นน้ำแทนการตกตะกอนก็ได้ ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างปริมาณของไดเพปไทด์ที่เกิดขึ้นกับปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในระบบ เร่งทิศทางของระบบให้เป็นไปในทางของการสังเคราะห์เพปไทด์ โดยวิธีเหล่านี้มักนิยมใช้สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่สูง (Guzmn *et al.*, 2007; Lombard *et al*., 2005; Yagasaki & Hashimoto, 2008)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดเพปไทด์แบบควบคุมสมดุล
ที่มา: Yagasaki & Hashimoto, 2008

2. *กระบวนการสังเคราะห์แบบควบคุมจลนศาสตร์ (kinetically controlled process)* เป็นกลไกที่อาศัยความจริงที่ว่าปลายคาร์บอกซิลเอสเทอร์ (C-terminal ester) หรือเอไมด์ (amide) ที่ถูกกระตุ้นสามารถให้หมู่เอซิล (acyl group) กับเอนไซม์โปรติเอสเฉพาะในกลุ่มเซรีนโปรติเอส (serine protease) หรือซีสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) เกิดเป็นสารตัวกลางเอซิลเอนไซม์ (acyl-enzyme intermediate) ที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาต่อกับน้ำหรือเติมกรดอะมิโนอีกหน่วย ซึ่งเปรียบเหมือนนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) สร้างพันธะเพปไทด์ขึ้นได้ ดังแสดงปฏิกิริยาในภาพที่ 3 และเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสสามารถสลายพันธะเพปไทด์ได้อย่างช้าๆ จึงทำให้มีการสะสมของปริมาณไดเพปไทด์เพียงชั่วคราว ด้วยเหตุนี้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงขึ้นกับความเร็วของเอซิลเอนไซม์ในการเข้าทำปฏิกิริยากับน้ำและนิวคลีโอไฟล์ชนิดอื่น หรือความเร็วในการสลายไดเพปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอสเอง ด้วยเหตุนี้การสังเคราะห์ไดเพปไทด์โดยกระบวนการนี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ ความแรงไอออน (ionic strength) และความเข้มข้นของนิวคลีโอไฟล์ให้คงที่ตลอดการเกิดปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการแตกตัวของหมู่เอซิลและนิวคลีโอไฟล์ที่อาจรบกวนระบบของปฏิกิริยาได้ การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แบบนี้มีข้อได้เปรียบเหนือกระบวนการสังเคราะห์แบบควบคุมสมดุลตรงที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในอัตราเร็วที่สูงกว่าและต้องการปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่น้อยกว่า เนื่องจากตัวให้หมู่เอซิล (acyl donor) ในระบบนั้นอยู่ในรูปของกรดคาร์บอกซิลิกที่ถูกกระตุ้น เอนไซม์โปรติเอสที่นิยมใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ชนิดนี้ ได้แก่ ปาเปน (papain) เทอร์มอไลซิน (thermolysin) ทริปซิน (trypsin) และแอลฟา-ไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) เป็นต้น (Guzmn *et al*., 2007; Yagasaki & Hashimoto, 2008)

จะเห็นได้ว่าการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาเคมีทั้งสองวิธีนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องในระบบ เพื่อเหนี่ยวนำทิศทางของปฏิกิริยาให้เป็นไปในทิศทางการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ รวมทั้งต้องอาศัยความจำเพาะและคุณสมบัติในการคัดเลือกที่สูงของเอนไซม์โปรติเอสในการทำปฏิกิริยา ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีการใช้ความรู้ทางวิศวกรรมมาปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสหรือสภาวะในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์เพปไทด์ที่เพิ่มขึ้น วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (Bornscheuer *et al*., 2002) สามารถสรุปได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ได้แก่



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดเพปไทด์แบบควบคุมจลนศาสตร์
ที่มา: Yagasaki & Hashimoto, 2008

- ***การทำวิศวกรรมสารตัวกลาง (medium engineering)*** เพื่อให้เหมาะกับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ โดยการแทนที่น้ำในระบบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นการผสมตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ เช่น เอทานอล ลงไปกับน้ำที่อยู่ในระบบด้วย ที่เรียกว่า ระบบโฮโมจีเนียส (homogeneous system) หรือการผสมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่สามารถเข้ากับน้ำได้ เช่น เฮกเซน ลงในระบบ ระบบแบบนี้เรียกว่า ระบบเฮเทโรจีเนียส (heterogeneous system) หรือที่บางครั้งเรียกว่าระบบสองชั้น (two-phase system) การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสมลงไปในระบบสารตัวกลางเช่นนี้ จะช่วยเพิ่มอัตราการสร้างพันธะเพปไทด์ของระบบการสังเคราะห์แบบควบคุมสมดุลและควบคุมจลนศาสตร์ได้

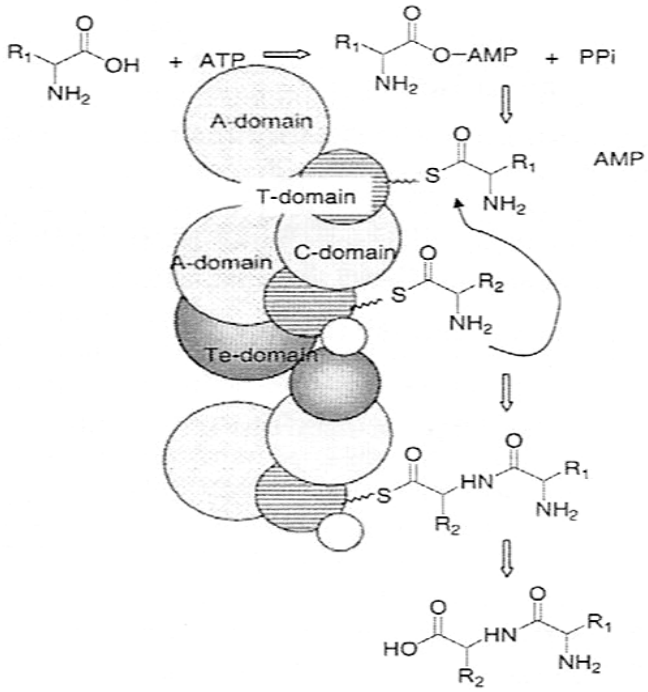
- ***การทำวิศวกรรมตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst engineering)*** เป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือเอนไซม์ให้เหมาะสมกับสภาวะการสังเคราะห์เพปไทด์นั้น ได้แก่ การเพิ่มความสามารถในการละลายของเอนไซม์โดยการดัดแปลงหมู่เคมีของเอนไซม์ให้สามารถแตกตัวให้และรับหมู่เอซิลได้มากขึ้น การตรึงเอนไซม์ (immobilization) ให้อยู่ในรูปที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก หรือการตัดต่อยีนและมิวเทชันตรงจุด (site-directed mutagenesis) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา ความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ และความจำเพาะต่อสับสเตรท เป็นต้น

- ***การทำวิศวกรรมสับสเตรท (substrate engineering)*** โดยการดัดแปลงภายในโมเลกุลของสับสเตรทให้มีหมู่อะมิโนอยู่ที่ปลายคาร์บอกซิล เหมือนกับกรดอะมิโนไลซีน และ อาร์จินีน เพื่อให้สามารถแตกตัวให้หมู่เอซิลได้มากขึ้น

การสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (Enzymatic synthesis)

เป็นการใช้เอนไซม์อื่นที่พบในสิ่งมีชีวิตและไม่เกี่ยวข้องกับระบบการสังเคราะห์เพปไทด์ในไรโบโซม (ribosome system) แต่สามารถสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนสองชนิดขึ้นไปได้ เช่น เอนไซม์เพปไทด์ซินทิเทสนอกไรโบโซม (nonribosomal peptide synthetase) หรือเรียกย่อว่า NRPS เอนไซม์โพลีกลูตามีนซินเทส (polyglutamine synthase) เอนไซม์ไซยาโนไฟซินซินทิเทส (cyanophycin synthetase) เอนไซม์กลูตาไทโอนซินเทส (glutathione synthase) เอนไซม์ดี-อะลานีน ดี-อะลานีนไลเกส (D-alanine-D-alanine ligase) และเอนไซม์แอล-อะมิโนเอซิดแอลฟาไลเกส (L-amino acid α-ligase) หรือเรียกย่อว่า Lal (Yagasaki & Hashimoto, 2008) การสังเคราะห์เพปไทด์โดยใช้ระบบเอนไซม์เหล่านี้ จำเป็นต้องมีการกระตุ้นกรดอะมิโนสับสเตรทของการสังเคราะห์ให้เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของอะมิโนเอซิลอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (aminoacyl-adenosine monophosphate หรือ AMP) สำหรับระบบเอนไซม์ NRPS หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอะมิโนเอซิลฟอสเฟต (aminoacyl phosphate) สำหรับระบบเอนไซม์ชนิดอื่นที่เหลือ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์เพปไทด์โดยใช้เอนไซม์นั้นมีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี หรือการใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาทางเคมี ตรงที่ไม่จำเป็นต้องมีการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันในกรดอะมิโนสับสเตรทก่อนการสังเคราะห์ จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์นั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าการสังเคราะห์โดยวิธีอื่น ทั้งนี้เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดที่สูงต่อกรดอะมิโนสับสเตรทเฉพาะ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียตรงที่ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นมีปริมาณต่ำ สำหรับในบทความฉบับนี้จะขอยกตัวอย่างหลักการทำงานของระบบเอนไซม์ NRPS และ Lal เท่านั้น

1. *การสังเคราะห์ด้วยระบบเอนไซม์ NRPS* ระบบเอนไซม์นี้เป็นระบบที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียและเชื้อรา (fungi) ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีความสำคัญทางเภสัชกรรม เช่น ยาปฏิชีวนะต้านจุลชีพ (antimicrobial) แวนโคไมซิน (vancomycin) หรือกรามิซิดินเอส (gramicidin S) และยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant drug) ไซโคลสโปรีน (cyclosporine) เป็นต้นโดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดนี้จะทำการเติมกรดอะมิโนทีละหน่วยให้ได้เป็นสายเพปไทด์โดยการสร้างพันธะเพปไทด์ขึ้นระหว่างหน่วยของกรดอะมิโนที่เติมลงไป จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์พบว่าประกอบด้วยโดเมน (domain) หลักทั้งสิ้น 4 โดเมน (ภาพที่ 4) ได้แก่



ภาพที่ 4 โดเมนทั้งสี่ของระบบเอนไซม์ NRPS และปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์
ที่มา: Yagasaki & Hashimoto, 2008

- *อะดีนีเลชั่นโดเมน (adenylation domain)* หรือ โดเมนเอ (A-domain) ทำหน้าที่จดจำกรดอะมิโนสับสเตรทและกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ ATP ได้เป็น หมู่ฟอสเฟตและ AMP จับที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนสับสเตรท เป็นการกระตุ้นกรดอะมิโนสับสเตรทให้พร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์

- *ไทโอเลชั่นโดเมน (thiolation domain)* หรือโดเมนที (T-domain) เป็นโดเมนที่รับกรดอะมิโนที่ถูกกระตุ้นจากโดเมนเอเข้ามาสลาย AMP ออกไปเพื่อให้พร้อมที่จะสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนสับสเตรทอีกหน่วยที่ถูกกระตุ้น

- *คอนเดนเซชั่นโดเมน (condensation domain)* หรือโดเมนซี (C-domain) เป็นโดเมนที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนที่ถูกกระตุ้นในโดเมนทีทั้งสองหน่วย

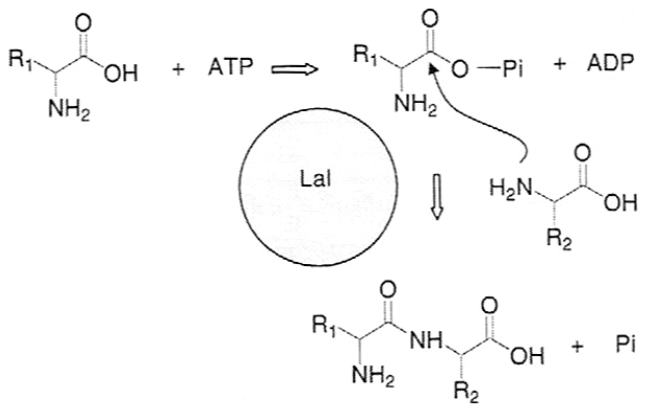
- *ไทโอเอสเทอเรสโดเมน (thioesterase domain)* หรือโดเมนทีอี (Te-domain) เป็นโดเมนที่ทำหน้าที่ปล่อยเพปไทด์ที่เกิดการสร้างจากโดเมนซีออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ และส่งต่อไปยังออร์แกเนลล์ (organelle) เป้าหมายต่อไป

2. *การสังเคราะห์ด้วยระบบเอนไซม์ Lal* เป็นระบบเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ (superfamily) เอมีนไทโอไลเกสชนิดต้องการพลังงาน ATP (ATP-dependent carboxylate-amine-thiol ligase) และต้องการหมู่เอซิลฟอสเฟต (acyl phosphate) เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยระบบเอนไซม์ชนิดนี้มีข้อดีคือมีการคัดเลือกกรดอะมิโนหลายชนิด เป็นสับสเตรทสำหรับปฏิกิริยา โดยมีลำดับการเรียงสายกรดอะมิโนที่ถูกต้อง แต่มีข้อจำกัดคือ กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด (acidic amino acid) หรือเบส (basic amino acid) และกรดอะมิโนใน

รูปดี-ไอโซเมอร์ (D-amino acid) จะไม่สามารถเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ รวมทั้งสามารถใช้ในการสังเคราะห์ได้เฉพาะไดเพปไทด์เท่านั้น ไทรเพปไทด์หรือเพปไทด์ที่มีสายยาวไม่สามารถสังเคราะห์ได้โดยเอนไซม์ชนิดนี้

การใช้เพปไทด์สังเคราะห์ในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทย ตลาดการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ไม่เพียงแต่จะอยู่ในรูปของเพปไทด์บริสุทธิ์ที่ผสมอยู่ในอาหารหรือเครื่องดื่มสุขภาพเท่านั้น ยังรวมไปถึงการผสมเพปไทด์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง (Klimova & Chebotarev, 1999; Ohta *et al.,* 1996) และใช้ทางการแพทย์ในรูปของฮอร์โมนหรือ สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แทนยาปฏิชีวนะ (Thammasirirak *et al*., 2008) ดังตัวอย่างเช่น การผสมเพปไทด์สังเคราะห์โดยตรงในครีมทารอบดวงตา ครีมบำรุงผิวหน้าและลำคอ เนื่องจากเพปไทด์สามารถแทรกซึมผ่านผิวหนังลึกลงไปกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (collagen) พร้อมทั้งยับยั้งกลไกการทำลายชั้นคอลลาเจนใต้ชั้นผิว เร่งการผลัดเซลล์ของชั้นผิว รวมทั้งช่วยกระตุ้นการสมานแผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อบริเวณใบหน้า เช่น หน้าผาก รอบดวงตา และร่องแก้ม ช่วยให้ผิวหน้าบริเวณที่ได้รับการบำรุงมีริ้วรอยลดลงได้ หรือการใช้คุณสมบัติของเพปไทด์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มาผลิตเป็นยาต้านจุลินทรีย์แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ และมีการพัฒนา สร้างยาต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นจากแหล่งเพปไทด์ธรรมชาติเช่น เลือดจระเข้ หรือพิษของงู ผึ้ง แมงป่อง เป็นต้น นอกจากนี้คุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่พบในเพปไทด์นั้นยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตยายับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร ยายับยั้งเชื้อที่ผิวหนัง หรือทำเป็นส่วนผสมในครีมทาป้องกันการติดเชื้อในคนไข้โรคเบาหวาน แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก และแผลพุพองติดเชื้อได้อีกด้วย สำหรับการใช้เพปไทด์ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น มีการใช้ในรูปแบบของการเติมเพปไทด์โดยตรงลงในผลิตภัณฑ์อาหารทดแทนการใช้สารกันบูดหรือเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับสัตว์ เป็นการเสริมโปรตีนให้ผลิตภัณฑ์และช่วยเสริมภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ที่ได้รับอาหารได้อีกด้วย (Klimova & Chebotarev, 1999; Ohta *et al.,* 1996; Thammasirirak *et al*., 2008) จากตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า เพปไทด์ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณประโยชน์หลากหลาย และมีปริมาณความต้องการเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการผลิตเพปไทด์ในปัจจุบันนั้นยังคงมีต้นทุนในการผลิตที่สูง และทำได้ในระดับปริมาณที่ไม่มากนัก ด้วยเหตุนี้งานวิจัยค้นคว้าเพื่อให้ได้มาซึ่งเทคโนโลยีที่คุ้มทุนที่สุดในการผลิตเพปไทด์ จึงยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับนักวิทยาศาสตร์ไทย และยังคงต้องมีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อประโยชน์และความปลอดภัยสูงสุดสำหรับผู้บริโภคต่อไป



ภาพที่ 5 การสร้างไดเพปไทด์จากการทำงานของระบบเอนไซม์ Lal
ที่มา: Yagasaki & Hashimoto, 2008

บทสรุป

การผลิตเพปไทด์ หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดจากกรดอะมิโนหลายหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ ซึ่งได้รับความนิยมหลากหลายในอุตสาหกรรมอาหาร การผลิตเครื่องสำอาง เภสัชกรรมและทางการแพทย์ อาศัยเทคโนโลยีการผลิตที่สำคัญ 3 วิธี ได้แก่ 1) การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี 2) การใช้เอนไซม์ร่วมกับปฏิกิริยาเคมี และ 3) การใช้เอนไซม์ในการสังเคราะห์ หลักการผลิตเพปไทด์โดยปฏิกิริยาแรก ประกอบด้วยขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญ ได้แก่ การป้องกันหมู่ฟังก์ชันในสายโซ่ข้างของกรดอะมิโนสับสเตรท การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลอิสระของกรดอะมิโนที่ถูกป้องกัน การควบคู่ปฏิกิริยาเพื่อเชื่อมต่อพันธะเพปไทด์ และการกำจัดหมู่ฟังก์ชันที่ถูกป้องกันออกจากเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ ได้เป็นสายเพปไทด์ที่มีความยาวของกรดอะมิโนระหว่าง 5 ถึง 80 หน่วย วิธีที่สองเป็นการผลิตเพปไทด์ขนาดเล็กที่มีกรดอะมิโนองค์ประกอบต่ำกว่า 10 หน่วย จากการเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ในสภาวะที่ปราศจากน้ำของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อใช้กรดอะมิโนสับสเตรทที่มีการป้องกันหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ข้างด้วยสารเคมีก่อนทำปฏิกิริยา สำหรับวิธีสุดท้ายเป็นการสังเคราะห์เพปไทด์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เพปไทด์ซินทิเทส หรืออะมิโนเอซิดไลเกส สร้างพันธะเพปไทด์ขึ้นระหว่างกรดอะมิโนอย่างมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยามากกว่าสองวิธีก่อนหน้า

เอกสารอ้างอิง

Berson, S.A., & Yalow, R.S. (1973). *Peptide Hormones*. New York: American Elsevier Pub. Co.

Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., & Krishna, S.H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*. *20* (10), 433-437.

Cunningham, C., & Porter, A.J. (1997). Recombinant proteins from plants-production and isolation of clinically useful compounds. *Methods in Biotechnology*. (*Vol. 3).* 308. Totowa, N.J.: Humana Press.

Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, C.J.M., Robets, C.W., Katsoyannis, P.G., & Gordon, S. (1953). The synthesis of an octapeptide amide with hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society*. *75* (19), 4879-4880.

Feliú, J. A., De Mas, C., & López-Santín, J. (1995). Studies on papain action in the synthesis of Gly-Phe in two-liquid-phase media. *Enzyme and Microbial Technology*. *17* (10), 882-887.

Gill, I., López-Fandiño, R. L., Jorba, X., & Vulfson, E.N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*. *18* (3), 162-183.

Guinn, R.M., Margot, A.O., Taylor, J.R., Schumacher, M., Clark, D.S., & Blanch, H.W. (1995). Synthesis and characterization of polyamides containing unnatural amino-acids. *Biopolymers*. *35*, 503-512.

Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. *10* (2), 279-314.

Hipkiss, A.R., & Brownson, C.A. (2000). A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. *57* (5), 747-753.

Hou, R.-Z., Zhang, N., Li, G., Huang, Y.-B., Wang, H., Xiao, Y.-P., Liu, Y.-J., Yang, Y., Zhao, L., & Zhang, X.-Z. (2005). Synthesis of tripeptide RGD amide by a combination of chemical and enzymatic methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. *37*, 9-15.

Katzen, F., Chang, G., & Kudlicki, W. (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*. *23* (3), 150-156.

Kimmerlin, T., & Seebach, D. (2005). "100 years of peptide synthesis": ligation methods for peptide and protein synthesis with application to β-peptide assemblies. *Journal of Peptide Research*. *65* (2), 229-260.

Klimova, O.A., & Chebotarev, V.Yu. (1999). Applications of collagenolytic protease preparations from invertebrates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. *128* (12), 670-672.

Kumar, D., & Bhalla, T.C. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *68* (6), 726-736.

Lombard, C., Saulnier, J., & Wallach, J.M. (2005). Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis. *Protein Peptide Letters*. *12*, 621-629.

Merrifield, B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. *85* (14), 2149-2154.

Ohta, M., Goto, A., Mori, K., Fukunaga, S.I., Nakayama, H., & Fujino, Y. (1996). A dextran-protease conjugate from cosmetic use. *Cosmetics and Toiletries*. *111* (6), 79-88.

Sergeeva, M.V., Paradkar, V.M., & Dordick, J.S. (1997). Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. *20*, 623-628.

Thammasirirak, S., Kutan, C., Preecharram, S., Daduang, S., & Svasti, J. (2008). Antimicrobial peptides (crocosins) from fresh waster crocodile, (Crocodylus siamensis) white blood cell extracts. *In Abstract of The 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference*. (p178). FEBS Journal. 275, 99-437.

Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *67* (2), 151-159.

Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., & Colman, A. (1991). A high level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*. *9* (9), 830-834.

Xue, X.T., Lu, D.S., Chen, Z.C., Wu, Q., Cai, Y., & Lin, X.F. (2003). Enzyme-catalyzed transesterification of unusual substrates: synthesis of acyclovir and L-ascorbic acid (vitamin C) vinyl esters. *Chinese Chemical Letters*. *14* (2), 163-166.

Yagasaki, M., & Hashimoto, S.I. (2008). Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *81*, 13-22.

Zubay, G.L. (1998). *Biochemistry.* (4thedition). The McGraw-Hill, Inc., USA.