บทความวิชาการ

ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพกับการสังเคราะห์ทางเคมี

พนารัตน์ อรุณรัติยากร*

บทคัดย่อ

ปัจจุบันตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพถูกนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์สารต่างๆ อย่างมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น อีกทั้งยังถูกนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์สารชนิดใหม่ด้วย และจากความก้าวหน้าของเทคนิคใหม่ๆ ทางพันธุวิศวกรรม เช่น metabolic engineering หรือ directed evolution และ combinatorial biocatalysis ทำให้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการสังเคราะห์ทางเคมีเกิดการพัฒนาและก้าวหน้าอย่างมาก ทั้งการใช้เพื่อสังเคราะห์สารเคมีพิเศษที่ใช้ในงานเฉพาะด้าน สารตัวกลางทางเภสัชกรรม เมตาบอไลท์ของยา ผลิตภัณฑ์ยา และสารชนิดใหม่

คำสำคัญ: ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ เอนไซม์ เอนไซม์เทียม metabolic engineering, directed evolution, combinatorial biocatalysis

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: panarata@swu.ac.th

Biocatalysts in Chemical Synthesis

Panarat Arunrattiyakorn*

ABSTRACT

Biocatalysis is currently employed to produce known substances more economically and for the synthesis of new compounds. The combination of new molecular biology technique, such as metabolic engineering, directed evolution, with combinatorial biocatalysis is poised to bolster this field and further advance the contribution of biocatalysis to the synthesis of fine chemicals, pharmaceutical intermediates, drug metabolites, drug products and new compounds.

Keywords: biocatalyst, enzyme, artificial enzyme, metabolic engineering, directed evolution, combinatorial biocatalysis

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

*Corresponding author, e-mail: panarata@swu.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันเคมีสะอาดเป็นหัวข้อที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ทุกแขนง โดยทั่วไปการสังเคราะห์ทางเคมีต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในการทำงาน เอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพนั้นถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมีมากขึ้น โดยเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะ กล่าวคือ เอนไซม์เลือกเร่งปฏิกิริยาต่อหมู่ฟังก์ชันหมู่ใดหมู่หนึ่งเพียงชนิดเดียวทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อชนิดของหมู่ฟังก์ชันในการเร่งปฏิกิริยา (chemoselectivity) เอนไซม์สามารถแยกความต่างของหมู่ฟังก์ชันเดียวกันในสภาวะแวดล้อมทางเคมีที่ต่างกันได้ทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาในตำแหน่งที่จำเพาะในโครงสร้างของสารตั้งต้นได้ อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่เกิดมักเกิดในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าโอกาสเกิดผลิตภัณฑ์มีได้หลายรูปแบบก็ตาม (regioselectivity) และเนื่องจากเอนไซม์เป็นไครัลคะตะลิสต์จึงเลือกทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะทางสเตอริโอเคมีหรือให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะทางสเตอริโอเคมีได้ (enantioselectivity หรือ diastereoselectivity) ด้วยความจำเพาะที่กล่าวมานี้ทำให้ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์มีความจำเพาะ เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในปริมาณเล็กน้อยหรือไม่เกิดเลย ไม่ใช้สภาวะรุนแรงในการทำปฏิกิริยาจึงเป็นการประหยัดพลังงานและสารเคมี อีกทั้งสามารถทำงานในชั้นน้ำจึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเอนไซม์จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ทางเคมีมากขึ้น

รูปแบบของเอนไซม์

สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมี อาจใช้ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์ เอนไซม์ตรึงรูป หรืออาจใช้ในรูปของเซลล์จุลินทรีย์ ทั้งนี้เอนไซม์แต่ละรูปแบบมีข้อดีและข้อด้อยต่างกัน คือ

เอนไซม์บริสุทธิ์ (purified enzyme) มีข้อดี คือ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ในรูปแบบอื่น มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงน้อย อีกทั้งเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้โดยตรง อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการทำเอนไซม์บริสุทธิ์ทำให้เพิ่มค่าใช้จ่าย และเอนไซม์บริสุทธิ์บางชนิดอาจไม่เสถียร

เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) มีข้อดีเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์มักทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น ทนต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเบสได้มากขึ้น อีกทั้งสามารถแยกเอนไซม์จากปฏิกิริยาได้ง่ายเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้และสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม การตรึงเอนไซม์เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการเตรียม

เอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme หรือ cell free extract) มีข้อดี คือ เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้โดยตรง ไม่มีค่าใช้จ่ายในการทำบริสุทธิ์หรือตรึงรูปเอนไซม์ และถึงแม้ว่าเอนไซม์นี้ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์แต่เนื่องจากเอนไซม์ทำงานได้อย่างจำเพาะทำให้สามารถใช้เอนไซม์นี้ในการสังเคราะห์สารได้ และได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

เซลล์จุลินทรีย์ (whole cells) เป็นการลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์หรือการตรึงรูปเอนไซม์ และเนื่องจากเซลล์สามารถสร้างโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ได้ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายสำหรับโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductase ที่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำงาน ซึ่งเป็นข้อดีที่ต่างจากเอนไซม์ในรูปแบบอื่น อย่างไรก็ตาม สำหรับเอนไซม์ที่ไม่ได้ส่งออกนอกเซลล์นั้น สารตั้งต้นต้อง

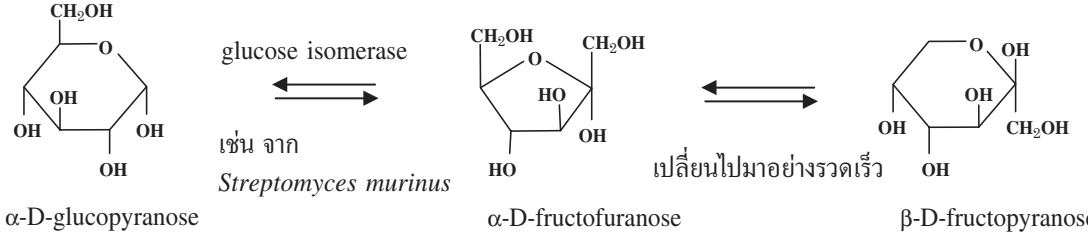
อาศัยการแพร่ผ่านผนังเซลล์เพื่อเข้ามาทำปฏิกิริยาจึงอาจทำให้เกิดข้อจำกัดได้ และภายในเซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด อาจทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดมีความซับซ้อนและเกิดผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ อีกทั้งหลังสิ้นสุดปฏิกิริยามักเกิดของเสียที่เป็นกากของเซลล์ในปริมาณมาก ปัจจุบันการใช้เซลล์จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์มีการใช้เทคนิคต่างๆ ทางพันธุวิศวกรรมเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยามากขึ้น

ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพกับการสังเคราะห์สารทางอุตสาหกรรม

♦ **อุตสาหกรรมสารเคมี** มีผลิตภัณฑ์ทางเคมีหลายชนิดที่มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในขั้นตอนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เช่น สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต กรดไขมันและอนุพันธ์ของกรดไขมัน สเตียรอยด์ เปปไทด์และบีตา-แลคแตม กรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน และอื่นๆ ซึ่งจะขอยกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ประสบความสำเร็จอย่างมากในการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในขั้นตอนการผลิต ดังนี้

ฟรุกโตสไซรัปกับการใช้กลูโคสไอโซเมอร์เรส (glucose isomerase)

การผลิตฟรุกโตสไซรัปในอุตสาหกรรมเริ่มจากการสังเคราะห์กลูโคสจากวัตถุดิบราคาถูก คือ แป้งข้าวโพด โดยแป้งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยวิธีทางเคมีหรือการใช้เอนไซม์หรือเป็นการผสมกันระหว่างวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์จนได้เป็นกลูโคสไซรัป สำหรับการเตรียมกลูโคสไซรัปด้วยวิธีทางเอนไซม์นั้น ขั้นแรกเป็นการใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (alpha amylase) ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ เปลี่ยนแป้งได้เป็นกลูโคส 10-20% และขั้นต่อมาเป็นการใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ทำให้ได้ไซรัปที่ประกอบด้วยกลูโคส 93-96% กลูโคสไซรัปนี้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานานแล้ว แต่อย่างไรก็ตาม ฟรุกโตสซึ่งมีความหวานมากกว่ากลูโคสและซูโครส และมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า แต่ไม่มีวิธีทางเคมีที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไอโซเมอร์จากกลูโคสเป็นฟรุกโตส (เปลี่ยนจากอัลโดส (aldose) เป็นคีโตส (ketose)) หรือแม้แต่การสังเคราะห์ฟรุกโตสจากแหล่งอื่น เช่น อินนูลิน (innulin) ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นปัจจุบันการผลิตฟรุกโตสไซรัปในอุตสาหกรรมจึงใช้เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอร์เรสในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นฟรุกโตส ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การสังเคราะห์ฟรุกโตสจากกลูโคสโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอร์เรส

กลูโคสไอโซเมอร์เรส (EC 5.3.1.5) มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันภายในโมเลกุลเพื่อเปลี่ยนจากอัลโดสเป็นคีโตส สำหรับการใช้เอนไซม์นี้ในอุตสาหกรรมการผลิตฟรุกโตสไซรัปจะใช้ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป ด้วยวิธีการนี้สามารถผลิตฟรุกโตสไซรัปที่ประกอบด้วยฟรุกโตสถึง 42% และปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีทางโครมาโทรกราฟีทำให้ได้ไซรัปที่ประกอบด้วยฟรุกโตสถึง 90% และจากการผสมกันระหว่างไซรัปที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 42% และ 90% ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จนได้ไซรัปที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 55% ซึ่งเหมาะแก่การใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มโดยเฉพาะโคคาโคลา และเป๊ปซี่ [1]

อะคริลาไมด์กับการใช้ไนไตรไฮดราเทส (nitrile hydratase)

อะคริลาไมด์ (acrylamide) ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พอลิอะคริลาไมด์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ถูกนำมาใช้อย่างมากเพื่อใช้ร่วมในการผลิตสารผนึกบรรจุภัณฑ์ สารยึดเกาะ เส้นใย กระดาษ แม่พิมพ์ สารที่ทำให้น้ำเกาะตัวกัน และสิ่งทอ ส่วนในห้องปฏิบัติการมีการใช้พอลิอะคริลาไมด์เป็นตัวกลางในการแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก สำหรับการผลิตอะคริลาไมด์ด้วยวิธีทางเคมีจะใช้คอปเปอร์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง (80-140°C) การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีนี้ทำให้เกิดของเสียที่เป็นพิษรวมถึงไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) อีกทั้งคอปเปอร์ก็มีราคาแพง และต้องการขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ หลายบริษัทจึงใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เอนไซม์ไนไตร-ไฮดราเทสจากเซลล์ตรึงรูปของ *Rhodococcus rhodochrous* ทำปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับอะคริโลไนไตร (acrylonitrile) [2] ดังรูปที่ 2

$$CH_2 = CH = CN + H_2O \xrightarrow{R.\ rhodochrous} CH_2 = CH = CONH_2$$

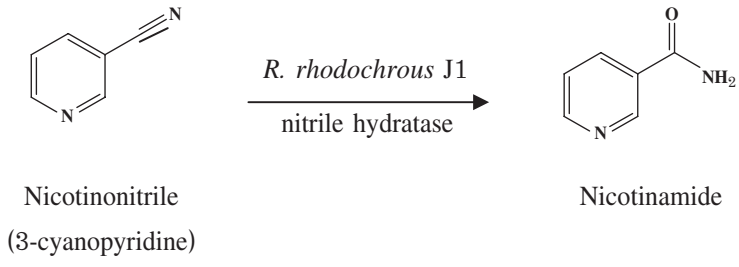
Acrylonitrile Acrylamide

รูปที่ 2 การสังเคราะห์อะคริลาไมด์จากอะคริโลไนไตร โดยอาศัยการทำงานของไนไตรไฮดราเทสจากเซลล์ตรึงรูปของ *R. rhodochrous*

ไนไตรไฮดราเทส (NHases; EC 4.2.1.84) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไลเอส เร่งปฏิกิริยาไฮเดรชันของไนไตร (nitriles) ไปเป็นอนุพันธ์เอไมด์ (amides) การผลิตอะคริลาไมด์ด้วยวิธีการนี้ทำให้ได้ร้อยละของผลผลิต (% yield) ของอะคริลาไมด์ถึงประมาณ 99.9% โดยมีการเติมสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยานี้ (เซลล์ตรึงรูปของ *R. rhodochrous*) สามารถผลิตอะคริลาไมด์ได้มากกว่า 7,000 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง วิธีการนี้มีความคุ้มทุนเมื่อเทียบกับการผลิตแบบดั้งเดิมที่ใช้คอปเปอร์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา บริษัท Nitto ของญี่ปุ่นรายงานว่าสามารถผลิตอะคริลาไมด์ด้วยวิธีการนี้ถึง 30,000 ตันต่อปี [3] และนี่เป็นอีกตัวอย่างของการประสบความสำเร็จในการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ไนไตรไฮดราเทส ยังถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์สารอื่นด้วย เช่น บริษัท Lonza Guangzhou Fine Chemicals ของสวิตเซอร์แลนด์ ได้เริ่มการผลิตนิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ซึ่งใช้

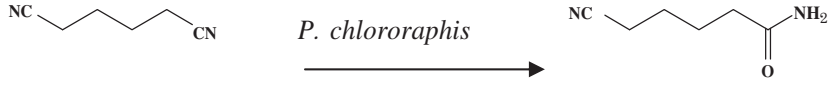
เป็นส่วนประกอบในอาหารของสัตว์และคน โดยการใช้เซลล์ตรึงรูปของ *R. rhodochrous* J1 ในการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง 3 ปฏิกิริยา คือ การเริ่มจาก 2-methyl-1,5-diaminopentane ถูกเปลี่ยนเป็น 3-methylpyridine และ 3-methylpyridine ถูก ammoxidized ไปเป็น 3-cyanopyridine ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ต่อได้เป็นนิโคตินาไมด์ ด้วยปฏิกิริยานี้ให้ร้อยละของการเปลี่ยนจากสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (% conversion) ถึงประมาณ 100% จึงให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงและของเสียจากปฏิกิริยาน้อยกว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี โดยบริษัทมีการผลิตนิโคตินาไมด์ ด้วยวิธีการนี้ประมาณ 3,000 ตันต่อปี [3] ดังรูปที่ 3



Nicotinonitrile (3-cyanopyridine) — Nicotinamide

รูปที่ 3 การสังเคราะห์นิโคตินาไมด์จากนิโคติโนไนไตร์ โดยอาศัยการทำงานของไนไตรไฮดราเทสจากเซลล์ตรึงรูป *R. rhodochrous* J1 ที่ตรึงอยู่บนพอลิอะคริลาไมด์

ส่วนบริษัท DuPont ของสหรัฐอเมริกา ใช้ไนไตรไฮดราเทสจาก *Pseudomonas chlororaphis* ในการเร่งปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับอดิโพไนไตร (adiponitrile) ไปเป็นอนุพันธ์เอไมด์ 5-cyanovaleramide ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ยาฆ่าแมลงชนิดใหม่ ดังรูปที่ 4 การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีทางเคมีโดยเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในปริมาณเล็กน้อย จากการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นเซลล์ตรึงรูปหนึ่งกิโลกรัมสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ถึง 3,150 กิโลกรัม และจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมื่อใช้สารตั้งต้นประมาณ 12 ตัน ในปฏิกิริยาการผลิตแบบต่อเนื่อง 58 ชุด (batches) พบว่าให้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 93% และให้ร้อยละของความจำเพาะของผลิตภัณฑ์ที่เกิด (% selectivity) เท่ากับ 96% [4]



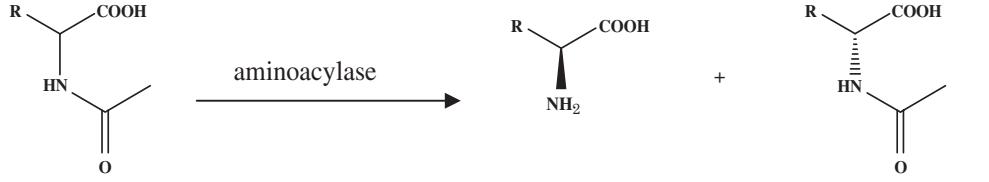
Adiponitrile — 5-Cyanovaleramide

รูปที่ 4 การสังเคราะห์ 5-cyanovaleramide จาก adiponitrile โดยอาศัยการทำงานของไตรไฮดราเทสจากเซลล์ตรึงรูป *P. chlororaphis*

กรดอะมิโน (Amino acid)

L-amino acid เป็นอิแนนทิโอเมอร์ของกรดอะมิโนที่พบส่วนใหญ่ในธรรมชาติ ปัจจุบันความต้องการกรดอะมิโนนี้เพื่อใช้อุตสาหกรรมอาหารและยามีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การสังเคราะห์สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ แต่วิธีทางเคมีไม่มีความจำเพาะทางสเตอริโอเคมี (L-form) ดังนั้นการผลิตในอุตสาหกรรมของกรดอะมิโนหลายชนิดจึงนิยมใช้วิธีการกึ่งสังเคราะห์ระหว่างวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ โดยสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์จะเป็นสารผสมของทั้งสองอิแนนทิโอเมอร์หรือเรียกว่าสารผสมราซีมิก (racemic) และใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาก่อให้เกิดอนุพันธ์ที่จำเพาะเพียงอิแนนทิโอเมอร์เดียว โดยกรดอะมิโนที่ได้มีรายงานว่าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการสังเคราะห์ ได้แก่ L-alanine, D-aspartic acid, L-aspartic acid, L-cysteine D-phenylalanine, L-phenylalanine, L-lysine, L-methionine, L-tryptophane, D-valine และ L-valine เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนแต่ละชนิดนั้นอาจแตกต่างกันขึ้นกับโครงสร้างของสารตั้งต้น เช่น สังเคราะห์ L-amino acid จากสารสังเคราะห์ที่เป็น D,L-acetyl-amino acid โดยใช้เอนไซม์อะมิโนเอซิลเลส (aminoacylase) จะเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 5 [5]

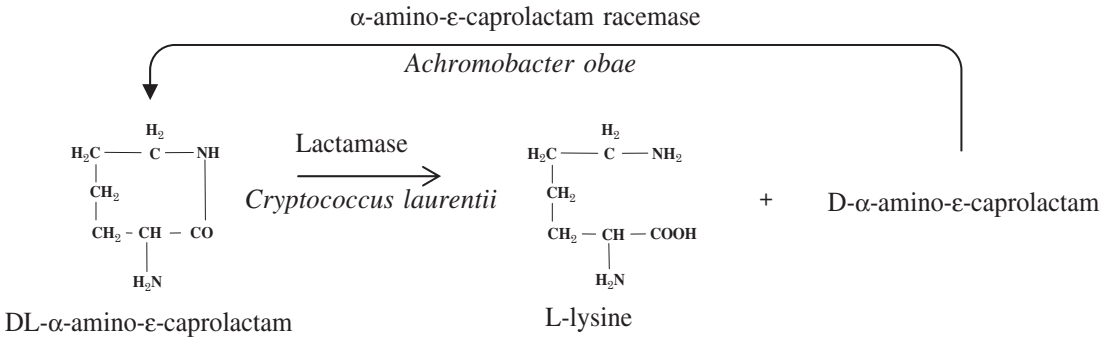
อะมิโนเอซิลเลสจะเลือกทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ L-acetyl-amino acid จนได้เป็น L-amino acid ซึ่งสามารถทำการแยกจากปฏิกิริยาได้โดยใช้เทคนิคการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange) หรือการตกผลึก ส่วน N-acetyl-D-amino acid ที่คงอยู่หลังปฏิกิริยา สามารถถูกนำกลับมาใช้ใหม่ได้ด้วยการใช้ thermal racemination หรือการใช้เอนไซม์ราซีเมส (racemase) จนได้เป็นสารผสมราซีมิกของ D,L-acetyl-amino เพื่อเข้าสู่ปฏิกิริยาอีกครั้ง ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์จากเซลล์ตรึงรูปของ *Aspergillus oryzae* เป็นแหล่งของอะมิโนเอซิลเลสในการสังเคราะห์กรดอะมิโนหลายชนิด [5]



N-Ac-D,L-amino acid L-amino acid N-Ac-D-amino acid

รูปที่ 5 การสังเคราะห์ L-amino acid จาก D,L-acetyl-amino acid โดยใช้เอนไซม์อะมิโนเอซิลเลส

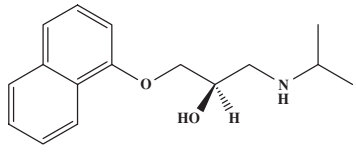
สำหรับการสังเคราะห์ L-lysine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นอีกชนิดที่มีปริมาณความต้องการในตลาดสูงมาก ตลาดใหญ่ของกรดอะมิโนนี้ คือ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ การผลิต L-lysine เริ่มจากสารสังเคราะห์ +DL-α-amino-ε-caprolactam และใช้เอนไซม์แลคตาเมส (lactamase) ซึ่งจะทำการไฮโดรไลซ์เฉพาะ L-α-amino-ε-caprolactam ได้เป็น L-lysine ส่วน D-α-amino-ε-caprolactam ที่เหลืออยู่ จะเป็นสารตั้งต้นของราซีเมสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารผสม DL-α-amino-ε-caprolactam และเข้าสู่ปฏิกิริยาใหม่ ดังรูปที่ 6 ซึ่งประมาณว่าในแต่ละปี มีการผลิตกรดอะมิโนนี้ถึง 300,000 ตัน และ 10% ของการผลิต ผลิตโดยบริษัท Toray Fine Chemical Co., Ltd ของญี่ปุ่น ซึ่งผลิตโดยวิธีการที่ได้กล่าวมานี้ [5]



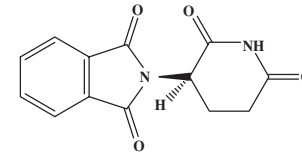
รูปที่ 6 การสังเคราะห์ L-lysine จาก DL-α-amino-ε-caprolactam โดยใช้แลคตาเมสจาก *C. laurentii*

♦ **อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรมและสารตัวกลางที่มีไครัลในโครงสร้าง**

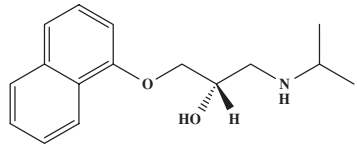
อิแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) เป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) แบบหนึ่งที่ใช้เรียกโมเลกุลที่มีองค์ประกอบอะตอมเหมือนกันแต่มีการเรียงตัวในสามมิติแตกต่างกัน ในลักษณะที่ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นภาพกระจกเงาซึ่งกันและกัน สารทั้งสองจึงไม่ใช่สารเดียวกัน อิแนนทิโอเมอร์มีความสำคัญอย่างมากทางเภสัชกรรม เนื่องจากสารที่มีอิแนนทิโอเมอร์ต่างกันอาจมีสมบัติที่ต่างกันได้ โดยอิแนนทิโอเมอร์ในรูปที่ออกฤทธิ์จะเรียกว่า eutomer และในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ต่ำกว่าจะเรียกว่า distomer ยกตัวอย่าง เช่น propranolol ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม β-Blockers ที่ใช้ในการรักษาโรคหัวใจในรูปของ (*S*)-enantiomer มีฤทธิ์มากกว่าในรูปของ (*R*)-enantiomer ถึง 130 เท่า หรือยา thalidomide ที่อยู่ในรูป (*R*)-enantiomer มีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ ส่วนในรูป (*S*)-enantiomer จะเป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในการพัฒนาของร่างกาย ดังรูปที่ 7 เนื่องจากความสำคัญของอิแนนทิโอเมอร์นี้เองทำให้ความบริสุทธิ์ของอิแนนทิโอเมอร์ของสารสังเคราะห์มีความสำคัญ ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะควบคุมให้การสังเคราะห์เกิดในอิแนนทิโอเมอร์เดียวนั้นมีข้อจำกัดมากมาย คือ ต้องการขั้นตอนที่ซับซ้อนและให้ร้อยละของผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ ต่างกับการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นไครัลคะตาลิสต์ ตัวอย่างของยา หรือสารตัวกลางที่มีไครัลในโครงสร้างและมีการผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพแสดงดังตารางที่ 1



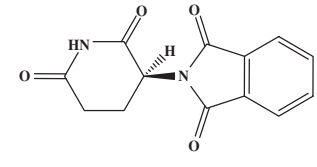
(*R*)-(+)-propranolol



(*R*)-(+)-thalidomide



(*S*)-(-)-propranolol



(*S*)-(-)-thalidomide

รูปที่ 7 โครงสร้างของ (*RS*)-propanolol และ (*RS*)-thalidomide

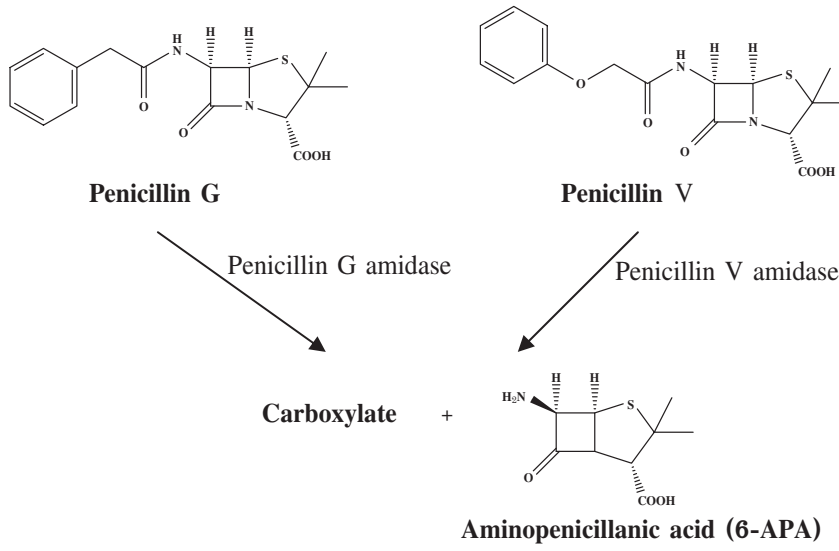
ตารางที่ 1 แสดงสารตัวกลางที่มีไครัลในโครงสร้างซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ยา โดยสารเหล่านี้มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยอาศัยปฏิกิริยาจากตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ [ดัดแปลงจาก 6]

ผลิตภัณฑ์	บริษัท	ปฏิกิริยา	ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ
β-lactams	Glaxo	Acylation	*Candida antarctica* lipase B
Lotrafiban	Glaxo	Hydrolysis	*Candida antarctica* lipase B
Paclitaxel	BMS	Hydrolysis	*Pseudomonas* lipase PS-30
Xemilofiban	Monsanto	Hydrolysis	*Escherichia coli* penicillin acylase
Lamivudine	Glaxo	Hydrolysis	*Escherichia coli* cytidine deaminase
N-Butyl DNJ	Pharmacia	Oxidation	*Gluconobactor oxydans* sorbitol dehydrogenase
2-Quinoxaline carboxylic acid	Pfizer	Oxidation	*Absidia repens* monooxygenase

6-Aminopenicillanic acid (6-APA) กับการใช้เพนิซิลินอะมิเดส (penicillin amidase)

เพนิซิลลิน (penicillins) เป็นสารกลุ่มบีตา-แลคแตม มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพได้หลายชนิด สามารถแยกได้จากราในกลุ่มเพนิซิลเลียม (*Penicillium* sp.) ปัจจุบันใช้เป็นยาในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย แต่พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติสามารถเกิดการกลายพันธุ์และต้านยานี้ได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนายาในกลุ่มเพนิซิลลินขึ้นโดยอาศัยขั้นตอนแบบกึ่งสังเคราะห์ (semisynthesis) โดยการตัดโซ่ข้าง (side chain) ที่เป็น phenylacetyl และ phenoxyacetyl ของ penicillin G และ penicillin V ตามลำดับ ได้เป็นโครงสร้างหลัก คือ 6-APA และแทนที่ด้วยโซ่ข้างอื่นๆ เช่น D-phenylglycine ได้เป็นสารออกฤทธิ์ที่เรียกว่า ampicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่เกิดจากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์ หรือแทนที่ด้วยโซ่ข้างที่เป็น D-hydroxyphenylglycine ก็จะได้เป็นสารออกฤทธิ์ที่เรียกว่า amoxicillin ดังนั้น 6-APA จึงใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาชนิดต่างๆ สำหรับการสังเคราะห์ 6-APA แต่เดิมใช้วิธีทางเคมีในการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) ของเพนิซิลลิน ให้ได้เป็น 6-APA แต่วิธีการนี้ทำให้เกิดการแตกของวงบีตา-แลคแตม นอกจากนี้ยังต้องการอุณหภูมิต่ำ (ประมาณ −80°C) ในการทำปฏิกิริยา และสภาวะในการทำปฏิกิริยาต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำ ทำให้ขั้นตอนทางเคมีมีความซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายมาก ปัจจุบันมีการสังเคราะห์ 6-APA ทางอุตสาหกรรมในปริมาณหลายพันตันต่อปี โดยใช้เอนไซม์เพนิซิลลินอะมิเดสดังรูปที่ 8

เพนิซิลลินอะมิเดส (EC 3.5.1.11) หรือเรียกว่าเพนิซิลลินเอซิลเลส (penicillin acylases) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ทำหน้าที่สลายพันธะระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเปปไทด์ เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อเอไมด์สายตรง (linear amides) ปัจจุบันมีการสังเคราะห์ 6-APA ด้วยวิธีการนี้อย่างแพร่หลาย และมีการผลิตเพนิซิลลินอะมิเดสทางการค้าในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป และเป็นที่น่าสนใจยิ่งคือนอกจากเอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการกำจัดโซ่ข้างของเพนิซิลลินให้ได้เป็น 6-APA แล้วยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอนุพันธ์ของกรดต่างๆ กับ บีตา-แลคแตมได้ด้วย จึงใช้เอนไซม์นี้ในการเชื่อมต่อโซ่ข้างชนิดต่างๆ กับ 6-APA ในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะต่างๆ เช่น การสังเคราะห์ อะมอกซิซิลลิน (amoxicillin) แอมพอซิลลิน (ampocillin) และซีฟาลีซิน (cephalexin) ซึ่งปัจจุบัน บริษัท Lilly ของสหรัฐอเมริกากำลังทดลองผลิตยาโลราคาร์เบฟ (loracarbef) ด้วยปฏิกิริยานี้ [4]

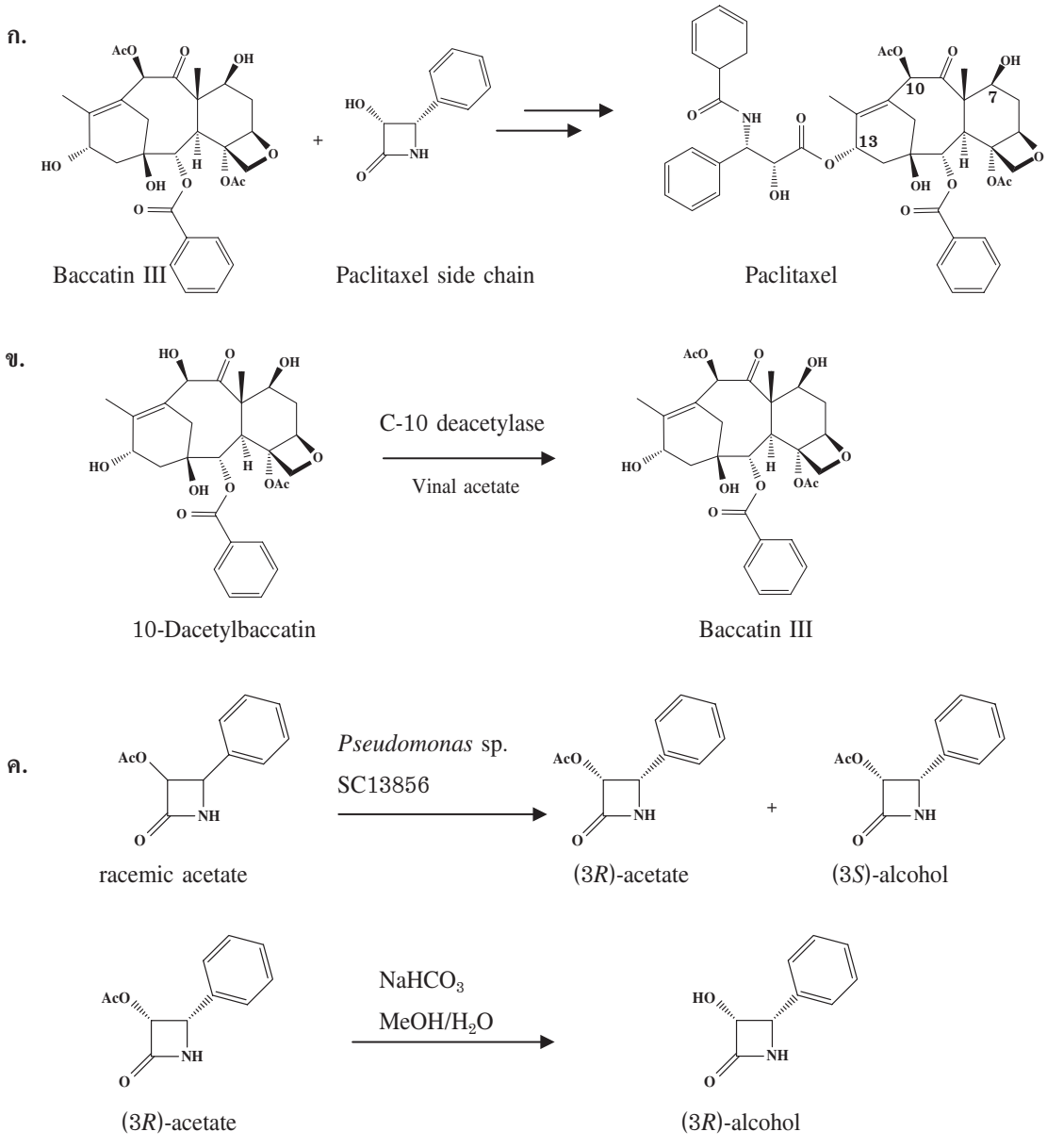


รูปที่ 8 การสังเคราะห์ aminopenicillanic acid จาก penicillin G หรือ penicillin V โดยอาศัยการทำงานของเพนิซิลลินอะมิเดส

Paclitaxel (Taxol®)

พาคลิแทคเซล (paclitaxel) เป็นสารกลุ่มพอลิไซคลิกไดเทอร์ปีน (polycyclic diterpene) มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยานี้ใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ พาคลิแทคเซลสามารถแยกได้จากเปลือกของต้น Yew (*Taxus brevifolia*) โดยเปลือกประมาณ 2,000 ปอนด์ (เท่ากับต้นไม้ 3,000 ต้น) สามารถแยกพาคลิแทคเซลได้ประมาณหนึ่งกิโลกรัม หรือคิดเป็นร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.7% อีกทั้ง *T. brevifolia* ยังเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้ามาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยการสังเคราะห์พาคลิแทคเซลด้วยวิธีทางเคมี แต่เนื่องจากสารมีโครงสร้างที่ซับซ้อนทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ยังไม่ดีพอ

จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกสารกลุ่มแทกเซน (taxanes) เช่น baccatin III (พาคลิแทคเซลที่ขาดโซ่ข้างในตำแหน่งที่ 13) และ 10-dacetylbaccatin III (พาคลิแทคเซลที่ขาดโซ่ข้างในตำแหน่งที่ 10 และ13) ได้จากหนามและยอดของต้น Yew สายพันธุ์ยุโรป (*Taxus baccata*) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์พาคลิแทคเซลดังนั้นจึงพัฒนาการสังเคราะห์พาคลิแทคเซลด้วยกระบวนการกึ่งสังเคราะห์โดยการเติมโซ่ข้างให้กับสารกลุ่มแทกเซน ดังรูปที่ 9 (ก) สำหรับ baccatin III ที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยานี้นอกจากได้จากแหล่งธรรมชาติแล้ว อาจได้จากการสังเคราะห์โดยการเติมหมู่อะซิเตตให้กับ 10-dacetylbaccatin III ที่ตำแหน่ง C-10 และจากการทดสอบพบว่าเอนไซม์ C-10 deacylase จากเชื้อ *Nocardioides* ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการกำจัดหมู่เอซิลแล้วยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิลให้กับ 10-dacetylbaccatin III ได้ด้วย จึงสามารถใช้เอนไซม์นี้ในการสังเคราะห์ baccatin III จาก 10-dacetylbaccatin III ซึ่งปฏิกิริยานี้ไม่ต้องมีการเติมหมู่ปกป้องให้กับหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-7 เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะสูงในการเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 9 (ข)



รูปที่ 9 การสังเคราะห์พาคลิแทคเซลด้วยวิธีกึ่งสังเคราะห์

(ก) การสังเคราะห์พาคลิแทคเซลโดยการเชื่อมโซ่ข้างเข้ากับ baccatin III

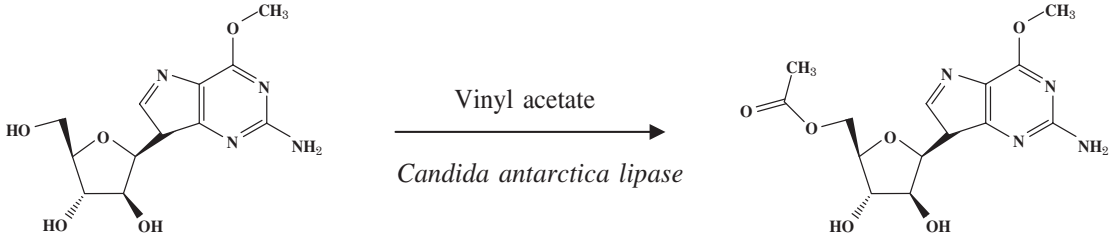
(ข) การสังเคราะห์ baccatin III ด้วยวิธีกึ่งสังเคราะห์จาก 10-dacetylbaccatin

(ค) ราซีมิกของ cis-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone เปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ (3*S*)-alcohol ด้วยเอนไซม์ BMS lipase จาก *Pseudomonas* sp. SC13856 และ (3*R*)-acetate ที่คงเหลืออยู่จากปฏิกิริยาถูกสังเคราะห์ต่อด้วยปฏิกิริยาเคมีให้เป็นอนุพันธ์ (3*R*)-alcohol ที่ใช้เป็นโซ่ข้างของการสังเคราะห์พาคลิแทคเซล

สำหรับโซ่ข้างที่เป็นไครัลที่จะเชื่อมต่อกับ baccatin III ในตำแหน่ง C-13 ในโครงสร้างของพาคลิแทกเซลเตรียมได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของราซีมิก cis-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone ไปเป็นอนุพันธ์ (3*S*)-alcohol ด้วยเอนไซม์ BMS lipase จาก *Pseudomonas* sp. SC13856 จากปฏิกิริยาจะได้ (3*R*)-acetate คงอยู่หลังปฏิกิริยา ซึ่ง (3*R*)-acetate จะถูกทำปฏิกิริยาต่อด้วยวิธีทางเคมีได้เป็นอนุพันธ์แอลกอฮอล์ เพื่อใช้เป็นโซ่ข้างในการสังเคราะห์พาคลิแทคเซลต่อไป ดังรูปที่ 9 (ค) ปฏิกิริยาโดยไลเปสนี้ให้ร้อยละของผลผลิตมากกว่า 48% (ร้อยละของผลผลิตที่มากที่สุดที่เป็นไปได้ตามทฤษฎี คือ 50%) และให้ % enantiomer excess มากกว่า 99.5% (สำหรับผลิตภัณฑ์ (3*R*)-acetate) ไลเปสตรึงรูปที่ใช้ในปฏิกิริยานี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 10 รอบ โดยเอนไซม์ไม่มีการสูญเสียกิจกรรมในการทำงาน [7]

Purine (506U78) กับการใช้ไลเปส

ปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิลให้กับ purine (506U78) ได้เป็นอนุพันธ์ที่กำลังพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (anti-leukaemic agent) การสังเคราะห์นี้พัฒนาโดยบริษัท GlaxoSmithKline ของสหราชอาณาจักร มีความจำเพาะทั้งทางเคมีและสเตอริโอเคมี (chemoselectivity และ regioselectivity) เป็นการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่แยกได้จาก *Candida antarctica* และเติม vinyl acetate ซึ่งเป็นตัวให้หมู่เอซิลลงในปฏิกิริยา เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิลให้กับ purine (506U78) ดังรูปที่ 10 จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์พบว่าร้อยละ 99 ของผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 5'-monoacyl acetate ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้มากกว่าสารตั้งต้น และทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมีนั้น พบว่าการสังเคราะห์ทางเคมีไม่สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว เนื่องจาก acylation reagent ที่ใช้ทางเคมีจะเกิด N-acetylation ได้ดีกว่า O-acetylation จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการเติมหมู่ปกป้อง ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนการสังเคราะห์และให้ร้อยละของผลผลิตที่น้อยกว่ามาก [8]



purine (506U78) 5'-monoacetate derivative

รูปที่ 10 การสังเคราะห์ purine (506U78) ด้วย *C. antarctica* lipase ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาโดยบริษัท GlaxoSmithKline

ความเชื่อที่คิดว่าเป็นข้อจำกัดในการใช้เอนไซม์เพื่อการสังเคราะห์ทางเคมี

เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเดิมเท่านั้น จากรายงานหลายฉบับพบว่ามีเอนไซม์หลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มไฮโดรเลสที่สามารถรับสารตั้งต้นที่หลากหลาย ทั้งสารธรรมชาติและสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งบางครั้งโครงสร้างของสารอาจต่างไปจากสารตั้งต้นทางธรรมชาติของเอนไซม์อย่างมาก เช่น ไลเปส โดยปกติทำการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ แต่พบว่าเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์จากคีโตนและแอลกอฮอล์ได้ หรือแม้แต่เร่งปฏิกิริยาการเกิดเอไมด์จากเอสเทอร์และแอมโมเนียได้ [9]

เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาในชั้นน้ำเท่านั้น เอนไซม์ส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ดีในชั้นน้ำ เนื่องจากเอนไซม์ต้องการน้ำในการคงรูปร่างสามมิติเพื่อการทำงาน ขณะเดียวกันสารตั้งต้นในปฏิกิริยาส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ ดังนั้นในการสังเคราะห์ทางเคมีที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอาจใช้สภาวะที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ผสมกับน้ำ หรือแม้แต่บางครั้งอาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียวในการทำปฏิกิริยา หรืออาจใช้เอนไซม์ตรึงรูปซึ่งสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น เช่น ในการสังเคราะห์ SCH-56592 (ยาต้านเชื้อราอยู่ระหว่างการทดสอบทางคลีนิค ระยะที่ 2) โดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่แยกจาก *C. antarctica* เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีในปฏิกิริยาที่มีตัวทำละลายเป็นอะซีโตไนไตร์ (acetronitrile) บริสุทธ์ [10] หรือเอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอส (hydroxynitrile lyase) จาก *Hevea brasilienis* ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็น (*S*)-cyanohydrins ด้วย % enantiomer excess ถึง 98-99% จากสารตั้งต้นที่เป็นแอลดีไฮด์ เมธิล แอลคิล หรือเมธิลฟีนิลคีโตนในสภาวะที่เป็นบัฟเฟอร์ผสมกับบิวทิลอีเทอร์ [11]

เอนไซม์สามารถรับสารตั้งต้นได้ในความเข้มข้นต่ำ หลายปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นในการสังเคราะห์บางครั้งจึงมีการเติมสารตั้งต้นในปริมาณน้อยแต่มีการเติมอย่างต่อเนื่อง หรือมีการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เอนไซม์ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ หรืออาจใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาแรกเป็นสารตั้งต้นให้กับปฏิกิริยาถัดไป เพื่อลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่ก็มีอีกหลายเอนไซม์ที่สามารถรับปริมาณของสารตั้งต้นในปริมาณมาก เช่น การสังเคราะห์สารตัวกลางสำหรับสังเคราะห์ Abacavir (Ziagen™ เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รีเวอรส์ทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) ซึ่งใช้เป็นยาในการต้านไวรัสเอดส์ ของบริษัท GlaxoSmithKline โดยสารตั้งต้นเป็นแลคแตมและใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) สามารถใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นถึง 100 กรัมต่อลิตร ในตัวทำละลายผสม [12] ขณะที่การสังเคราะห์สารนี้โดยบริษัท Chirotech ของสหราชอาณาจักรใช้เอนไซม์ที่ต่างไป คือ แกมมา-แลกตาเมส (γ-lactamase) ที่สามารถรับสารตั้งต้นได้ถึง 500 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี [13]

เอนไซม์มีความเสถียรต่ำ เอนไซม์เป็นสารชีวภาพและอาจเสียสภาพจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน ความเป็นกรดเบส และอื่นๆ ดังนั้นในการสังเคราะห์ทางเคมีสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ด้วยการตรึงรูปในรูปแบบต่างๆ เช่น การตรึง penicillin G amidase โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์กับตัวค้ำจุน สามารถทำงานได้ถึง 1,000 ชุด (batch) ในการสังเคราะห์ 6-APA จาก penicillin G [14]

เทคนิคใหม่ในการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเพื่อการสังเคราะห์สารเคมี

Metabolic engineering

วิธีการนี้เป็นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการดัดแปลงวิถีเมตาบอลิซึมเพื่อจุดประสงค์ต่างๆ ได้แก่ (1) เพื่อปรับปรุงให้ได้ร้อยละของผลิตผลที่มากขึ้น (2) เพื่อให้เอนไซม์สามารถรับกับสารตั้งต้นที่หลากหลายขึ้น (3) เพื่อลดปริมาณการเกิดของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการ และ (4) เพื่อเป็นการสร้างวิถีในการสังเคราะห์สารใหม่ เช่น ในการสังเคราะห์ยา Tamiflu® ของบริษัท Roche ที่ใช้รักษาในการต้านไวรัสนั้นต้องการ shikimic acid เป็นสารตั้งต้น โดย shikimic acid เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์กรดอะมิโนประเภท aromatic amino acid (ได้แก่ L-phenylalanine, L-tyrosine และ L-tryptophan) ซึ่งวิถีของ shikimic นี้สามารถพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ โดย shikimic acid สามารถแยกได้จากผลของต้น Illicium แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ต้องการพืชจำนวนมากและเสียค่าใช้จ่ายสูง สำหรับการสังเคราะห์ Tamiflu® ในระยะแรกเพื่อใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ shikimic acid ถูกสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีจาก quinic acid แต่สำหรับการสังเคราะห์ยานี้ในอุตสาหกรรมต้องการการสังเคราะห์ในปริมาณมาก จึงมีการนำวิธีของ metabolic engineering มาใช้ โดยทำการปรับแต่งวิถีเมตาบอลิซึมของ shikimic acid ใน *E. coli* ให้หยุดการสังเคราะห์ aromatic amino acid หลังจากที่สร้าง shikimic acid แล้ว ทำให้เซลล์เกิดการสะสม shikimic acid และด้วยวิธีการนี้สามารถผลิต shikimic acid ได้มากถึง 84 กรัมต่อลิตร [15] หรือตัวอย่างของ amide synthetase CloL จาก Streptomyces ซึ่งเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนการสังเคราะห์ aminocoumarin ที่ใช้เป็นสารต้านจุลชีพ จากการทดสอบพบว่าเมื่อบ่มเชื้อสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการปรับแต่งวิถีเมตาบอลิซึมในการสังเคราะห์ aminocoumarin กับสารตั้งต้นที่สังเคราะห์ขึ้น 13 ชนิด ทำให้เกิดสารใหม่ในกลุ่มของ aminocoumarin ถึง 32 ชนิด [16] หรือการใช้เทคนิคนี้ในการสังเคราะห์สารใหม่ เช่น การใช้ *E. coli* ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ไม่สามารถพบได้ในธรรมชาติ (unnatural L-α-amino acids) โดยทำการปรับแต่งพันธุกรรมในวิถีการควบคุมการสังเคราะห์ O-acetylserine ให้มีการสังเคราะห์สารนี้ในปริมาณมากเพียงพอต่อเอนไซม์ O-acetylserine-sulfhydrylase หลังจากนั้นมีการเติมสารเริ่มต้น (precursor) ที่ไม่ใช่สารธรรมชาติ (unnatural part) ลงในขั้นตอนการหมักของ *E. coli* สายพันธุ์กลายนี้ทำให้เกิดการสังเคราะห์สารใหม่ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ตัวยับยั้งโปรตีเอสของ HIV (HIV-protease inhibitor) [17]

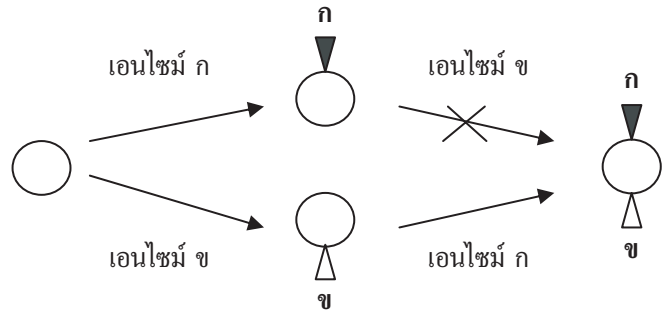
Directed evolution

เป็นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอของยีนสำหรับเอนไซม์นั้นๆ โดยอาศัยการทำงานของ Error Prone Polymerase Chain Reaction ซึ่งความผิดปกติที่เกิดส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์แบบ point mutation แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift และ deletion ได้ด้วย หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอเหล่านี้มาชักนำให้เกิดการแสดงออกเป็นโปรตีน ซึ่งการกลายพันธุ์เหล่านี้อาจทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น สามารถรับสารตั้งต้นได้ด้วยความเข้มข้นที่มากขึ้น หรืออาจรับสารตั้งต้นที่โครงสร้างหลากหลายมากขึ้น สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้น หรือแม้แต่มีความจำเพาะทางสเตอริโอเคมีมากขึ้นก็เป็นได้ เช่น การใช้เทคนิค directed evolution กับเอนไซม์ cytochrome P450 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิจิเนสและมีความเสถียรต่ำ ทำให้ได้เอนไซม์ที่สามารถรับ

สารตั้งต้นชนิดใหม่ๆ ได้ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ทางชีวภาพในการทำงาน และเพิ่มกิจกรรม chloroperoxidase ของเอนไซม์ด้วย [18]

Combinatorial biocatalysis

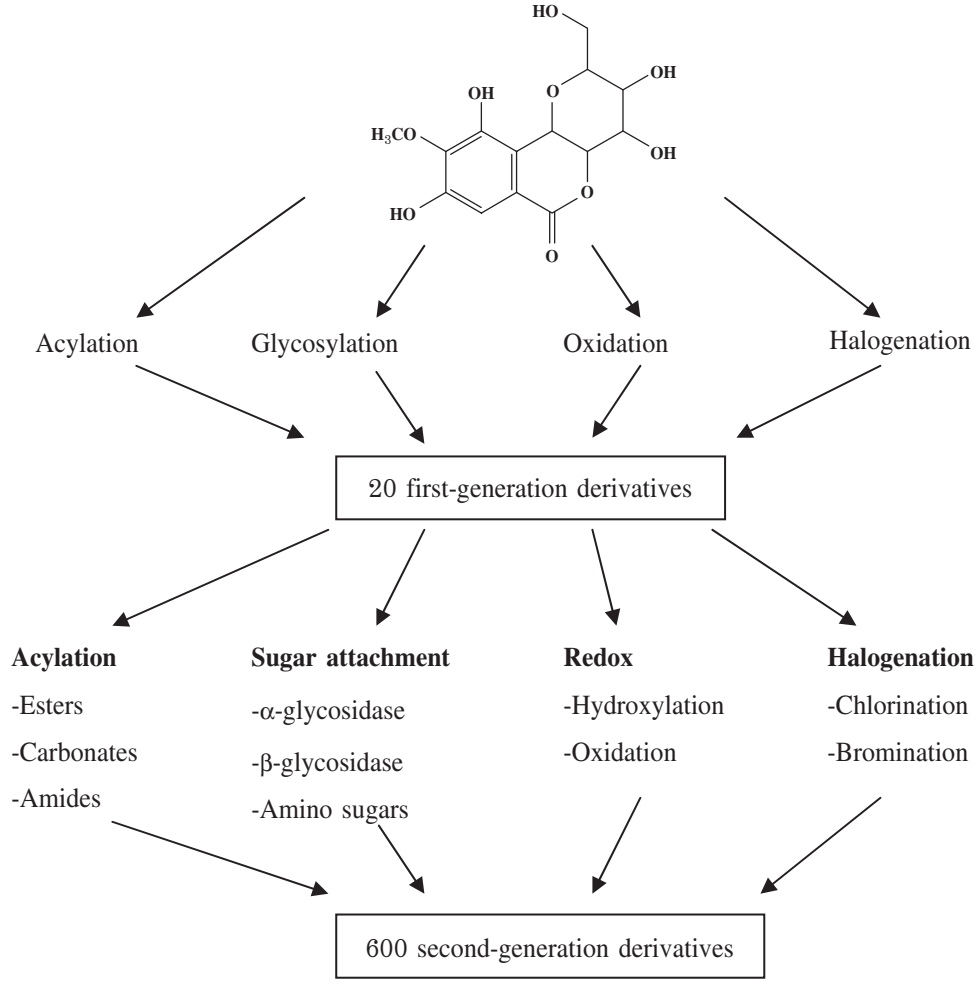
เป็นการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาหลายชนิดเพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ ของสารที่มีอยู่ ทำให้ได้อนุพันธ์ที่หลากหลายของสารตัวเดียวกัน วิธีการนี้ถูกนำมาใช้อย่างมากในการค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆ หลักการของวิธีการนี้ เช่น การเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ ก อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่สามารถเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ตัวต่อไป คือ เอนไซม์ ข ได้ ขณะที่ถ้าใช้เอนไซม์ ข เป็นปฏิกิริยาเริ่มต้น จะไม่มีผลกระทบกับการทำงานของเอนไซม์ ก ดังรูป



ตัวอย่าง เช่น พาคลิแทคเซล (ดูโครงสร้างสารได้จากรูปที่ 9) ที่ใช้เป็นยาในการรักษามะเร็ง ข้อจำกัดของยานี้ คือ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ ทำให้มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา ดังนั้นจึงมีความพยายามในการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้น สำหรับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารด้วยวิธีทางเคมีนั้นต้องการขั้นตอนในการเติมหมู่ปกป้องเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาในส่วนที่ไม่ต้องการ ดังนั้นจึงมีการเลือกใช้วิธีทางเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา เช่น การใช้เทคนิค combinatorial biocatalysis แบบ 2 ขั้นตอนในการสังเคราะห์อนุพันธ์ ขั้นแรกเป็นการเปลี่ยนแปลงที่หมู่ไฮดรอกซิลหมู่ใดหมู่หนึ่งใน 3 หมู่ที่มีอยู่ในโครงสร้างของพาคลิแทคเซล จากการทดสอบพบว่าเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (thermolysin) สามารถทำการเติมหมู่เอซิลต่างๆ เข้าไปที่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 2 ได้ โดยมีการใช้หมู่เอซิลต่างๆ กัน 14 ชนิด เช่น เอสเทอร์ ไดเอสเทอร์ คาร์บอเนต และไบคาร์บอเนต ใช้เอนไซม์ชนิดที่สอง คือ ไลเปส จาก *Candida antartica* ทำการเชื่อมต่อน้ำตาลที่มีหมู่ฟังก์ชันชนิดใหม่เข้าไปในโครงสร้าง หรือทำการไฮโดรไลซ์ตำแหน่งจำเพาะในโครงสร้าง จากวิธีการนี้ทำให้ได้อนุพันธ์ทั้งหมด 28 ชนิด และได้อนุพันธ์ที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น 1,625 เท่า เมื่อเทียบกับพาคลิแทคเซล [19]

อีกตัวอย่างเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบอร์จินิน (bergenin) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการบรรเทาปวด ต้านการอักเสบ และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยรอบแรกเป็นการสังเคราะห์แบบคู่ขนาน (parallel) ของปฏิกิริยาต่างๆ คือ เอซิลเลชัน ไกลโคซิลเลชัน ออกซิเดชัน ฮาโลจิเนชัน และรอบที่สองเป็นการใช้ปฏิกิริยาเอซิลเลชัน การเชื่อมต่อกับน้ำตาล รีดักชัน และฮาโลจิเนชัน ด้วยวิธีการทั้งหมดเหล่านี้ทำให้ได้อนุพันธ์ชนิดใหม่มากถึง 600 ชนิด โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์เป็นการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ 16 ชนิด และใช้เซลล์จุลินทรีย์ 25 ชนิดเป็นแหล่งของตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์ ดังรูปที่ 11 [20] จะเห็น

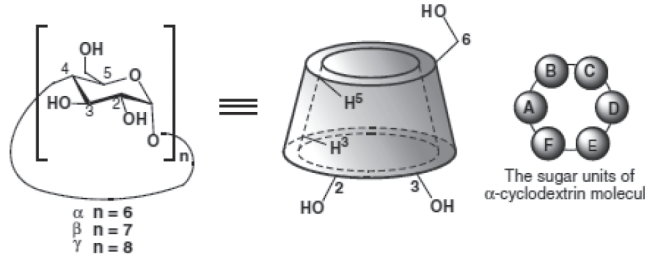
ได้ว่า วิธีการของ combinatorial biocatalysis นี้สามารถสังเคราะห์กลุ่มสารให้ได้อนุพันธ์ที่หลากหลาย จึงเหมาะกับการทดสอบหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆ ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ได้ด้วย



รูปที่ 11 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ bergenin ด้วยเทคนิค combinatorial biocatalysis โดยใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ 16 ชนิด และใช้เซลล์จุลินทรีย์ 25 ชนิด เกิดอนุพันธ์ของ bergenin ทั้งหมด 600 ชนิด [ดัดแปลงจาก 20]

เอนไซม์เทียม (Artificial enzyme)

ปัจจุบันมีการสังเคราะห์เอนไซม์เทียม (artificial enzyme) หรือเรียกว่า chemzyme ขึ้น เพื่อเลียนแบบการทำงานของเอนไซม์ เพื่อเพิ่มความหลากหลายของสารตั้งต้นและปฏิกิริยาที่เกิดและเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา โดย chemzyme เป็นโมเลกุลเล็กๆ ที่ประกอบด้วยสองส่วน คือ บริเวณที่ให้สารตั้งต้นมาจับและบริเวณเร่งในการเกิดปฏิกิริยา chemzyme ที่สังเคราะห์ขึ้น จะใช้พื้นฐานจากโครงสร้างของ cyclodextrin หรือ cryptand หรือ catalytic antibody และอื่นๆ สำหรับไซโคลเดร็กตริน (cyclodextrin) ซึ่งถูกใช้อย่างมากในการสังเคราะห์ chemzyme เป็นโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วย $\alpha(1\rightarrow4)$-D-glucopyranoside ในรูป chair conformation เป็นหน่วยย่อย โดยไซโคลเดร็กตรินอาจประกอบด้วยกลูโคส 6 หรือ 7 หรือ 8 หน่วย ซึ่งเรียกว่า แอลฟา-ไซโคลเดร็กตริน บีตา-ไซโคลเดร็กตริน และแกมมา-ไซโคลเดร็กตริน ตามลำดับ (ดังรูปที่ 12) ไซโคลเดร็กตรินเหล่านี้จะอยู่ในรูปกรวย มีส่วนชอบน้ำอยู่ด้านนอก และส่วนไม่ชอบน้ำอยู่ด้านใน สำหรับส่วนที่ชอบน้ำเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลซึ่งสามารถทำการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อเชื่อมต่อกับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ สำหรับใช้ในการเร่งปฏิกิริยา และส่วนภายในรูปกรวยซึ่งเป็นส่วนไม่ชอบน้ำ ใช้เป็นบริเวณจับกับสารตั้งต้นเพื่อเกิดปฏิกิริยา โดยแอลฟาไซโคล-เดร็กตรินซึ่งเป็นไซโคลเดร็กตรินตัวเล็กที่สุดจะมีช่องว่างภายในขนาดเล็กจึงสามารถจับกับโมเลกุลที่มีโครงสร้างคล้ายกับกรดไขมันและพวกโซ่ยาวที่ไม่มีการแตกกิ่ง ส่วนบีตา-ไซโคลเดร็กตรินสามารถจับกับพวก phenyl, naphthalene หรือ cholesterol ส่วนแกมมา-ไซโคลเดร็กตรินที่มีขนาดใหญ่ที่สุดสามารถจับกับ C_{60} buckminsterfullerene ทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง ปัจจุบัน chemzyme ที่สังเคราะห์ได้สามารถเร่งปฏิกิริยาเลียนแบบการทำงานของ glycosidase, epoxidase, oxidase, esterase ปฏิกิริยา cycloaddition รวมทั้งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อของโมเลกุลต่างๆ [21]



รูปที่ 12 โครงสร้างพื้นฐานของไซโคลเดร็กตริน [21]

จากบทความนี้ จะเห็นได้ว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพนี้ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์สารต่างๆ มากมาย ทั้งในอุตสาหรรมการผลิตสารเคมีทั่วๆ ไป ไปจนถึงการสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ใช้เป็นสารตัวกลางทางเภสัชกรรมหรือยาชนิดต่างๆ ปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางด้านพันธุวิศวกรรมทำให้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเหล่านี้เป็นที่สนใจมากยิ่งขึ้น อีกทั้งปัจจุบันมีการสังเคราะห์เอนไซม์เทียมขึ้นเพื่อให้เร่งปฏิกิริยาที่กำหนดได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Straathof, A., and Adlercreutz, P. 2000. Applied Biocatalysis. 2nd Edition. UK. Hardwood Academic Publishers. p. 98-99.
2. Straathof, A., and Adlercreutz, P. 2000. Applied Biocatalysis. 2nd Edition. UK. Hardwood Academic Publishers. p. 135-136.
3. Thomas, S. M., DiCosimo, R., and Nagarajan, V. 2002. Biocatalysis: Applications and Potentials for the Chemical Industry. *Trends in Biotechnology* 20: 238-242.
4. Zaks, A. 2001. Industrial Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 130-136.
5. Straathof, A., and Adlercreutz, P. 2000. Applied Biocatalysis. 2nd Edition. UK. Hardwood Academic Publishers. p. 124-125.
6. Straathof, A., Panke, S., and Schmid, A. 2002. The Production of Fine Chemicals by Biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 548-556.
7. Patel, R. N. 2002. Microbial/Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 804-826.
8. Rasor, J. P., and Voss, E. 2001. Enzyme-Catalyzed Processes in Pharmaceutical Industry. *Applied Catalysis A: General* 221: 145-158.
9. Balkenhohl, F., Hauer, B., Ladner, W., Schnell, U., Pressler, U. and Staudenmaier, H. R. 1995. Lipase katalysierte Acylierung von Alkoholen mit Diketenen, BASF AG, DE Patent 4329293 A1.
10. Morgan, B., Dodds, D. A., Zaks, A., Andrews, D. R., and Klesse, R. 1997. Enzymatic Desymmetrization of Prochiral 2-Substituted-1,3-propanediols: A Practical Chemoenzymatic Synthesis of a Key Precursor of SCH51048, a Broad-Spectrum Orally Active Antifungal Agent. *Journal of Organic Chemistry* 62: 7736-7743.
11. Griengl, H., Klempier, N., Pöchlauer, P., Schmidt, M., Shi, N., and Zabelinskaja-Mackova, A. A. 1998. Enzyme Catalysed Formation of (*S*)-Cyanohydrins Derived from Aldehydes and Ketones in a Biphasic Solvent System. *Tetrahedron* 54: 14477-14486.
12. Mahmoudian, M., Lowdon, A., Jones, M., Dawson, M., and Wallis, C. 1999. A Practical Enzymatic Procedure for the Resolution of *N*-Substituted 2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. *Tetrahedron: Asymmetry* 10: 1201-1206.
13. Taylor, S. J. C., Brown, R. Ac., Keene, P. A., and Taylor, I. N. 1999. Novel Screening Methods: The Key to Cloning Commercially Successful Biocatalysts. Bioorganic & *Medicinal Chemistry* 7: 2163-2168.
14. Giesecke, U. 1999. Product description PGA-450, 1999. Available from URL: http://indbio.roche. com/indbio/Ind/PGA/f_p0.htm. 28 March 2011.

15. Ran, N., Draths, K., and Frost, J. W. 2004. Creation of a Shikimiate Pathway Variant. *Journal of the American Chemical Society* 126: 6856-6857.
16. Galm, U., Dessoy, M. A., Schmidt, J., Wessjohannn, L. A., and Hode, L. 2004. *In vitro* and *in vivo* Production of New Aminocoumarins by a Combined Biochemical, Genetic, and Synthetic Approach. *Chemistry & Biology* 11: 173-178.
17. Maier, T. H. P. 2003. Semisynthetic Production of Unnatural L-α-Amino Acids by Metabolic Engineering of the Cysteine-Biosynthetic Pathway. *Nature Biotechnology* 21: 422-427.
18. Cirino, P. C., and Arnold, F. H. 2002. Protein Engineering of Oxygenases for Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 130-135.
19. Khmelnitski, Y. L., Budde, C., Arnold, J. M., Usyatinsky, A., Clark, D. S., and Dordick, J. S. 1997. Synthesis of Water Soluble Paclitaxel Derivatives by Enzymatic Acylation. *Journal of the American Chemical Society* 119: 11554-11555.
20. Michels, P. C., Khmelnitsky, Y. L., Dordick, J. S., and Clark, D. S. 1998. Combinatorial Biocatalysis: A Natural Approach to Drug Discovery. *Trends in Biotechnology* 16: 210-215.
21. Bjerre, J., Rousseau, C., Marinescu, L., and Bols, M. 2008. Artificial Enzymes, “Chemzymes”: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 1-11.

ได้รับบทความวันที่ 28 มิถุนายน 2554
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 20 กันยายน 2554