

## เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์

ภัสราวดี เผ่าจินดา<sup>1\*</sup>, นภัสรณ์ พิมพ์ศิริ<sup>1</sup>, นันทวดี เนียมบุญ<sup>1</sup>, ปิยะ วงศ์ญาณิน<sup>1</sup>,  
ประมุล อรุณจรัส<sup>1</sup>, นิตติญา ชาวชายโขง<sup>2</sup>, รนิตา ต่วนอุดม<sup>3</sup>, วรัญญา อิมประสิทธิ์ชัย<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

<sup>3</sup>ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพพรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี กรุงเทพมหานคร

<sup>4</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร

\*Corresponding author email: patsarawadee.pa@bsru.ac.th

ได้รับบทความ: 16 กุมภาพันธ์ 2566

ได้รับบทความแก้ไข: 19 มิถุนายน 2566

ยอมรับตีพิมพ์: 1 กรกฎาคม 2566

### บทคัดย่อ

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (E.C.1.11.1.7) ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตสพบทั่วไปในธรรมชาติ สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นได้หลายตัว เช่น guaiacol และ pyrogallol เป็นต้น ได้รับความนิยมนำมาใช้ในด้านวิจัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา บำบัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเสีย กำจัดเพอร์ออกไซด์จากวัตถุพิษในอุตสาหกรรมอาหาร และตัวตรวจวัดทางชีวภาพ เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ทั้ง 7 ชนิด ประกอบด้วย *Arabidopsis thaliana* (พืชต้นแบบ), *Armoracia rusticana* (ฮอสแรดิช), *Escherichia coli* (แบคทีเรีย), *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Homo sapiens* (มนุษย์), *Ipomoea batatas* (มันเทศ), *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์) จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) โดยเครื่องมือชีวสารสนเทศวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี-กายภาพบนซอฟต์แวร์ ExpASY SIB Bioinformatics SOPMA

tool เปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายโปรตีน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบนซอฟต์แวร์ ClustalW พบความยาวลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ตั้งแต่ 58-352 ตัว, Theoretical pI 4.72-8.76, ค่าประจุลบรวม (Asp + Glu) 2-45, ค่าประจุบวกรวม (Arg + Lys) 3-32, extinction coefficient 8980-32680, Instability index 26.05-59.62 และ Grand average of hydropathicity (GRAVY) -0.442-0.190 จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสระหว่างฮอสเตรดิซ กับ พืชต้นแบบ, แบคทีเรีย, ถั่วเหลือง, มนุษย์, มันเทศ, ยีสต์ พบค่า percent identity สูงที่สุดในพืชต้นแบบร้อยละ 65.70 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงถึงความยาวของกิ่งวิวัฒนาการที่สั้นในสิ่งมีชีวิต 4 ชนิด ได้แก่ ฮอสเตรดิซ, พืชต้นแบบ, ถั่วเหลือง และ มันเทศ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน จากผลการศึกษาช่วยให้มีความเข้าใจถึงข้อมูลเพอร์ออกซิเดสที่มีบทบาทในการพัฒนาวิศวกรรมเอนไซม์ที่ส่งเสริมศักยภาพในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ และกระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพ

**คำสำคัญ:** เพอร์ออกซิเดส / ลำดับกรดอะมิโน / ชีวสารสนเทศ

## A Comparative Computational Analysis of Amino Acid Sequences and Biochemical Properties of Peroxidase Enzymes in Plants, Yeast, Bacteria and Humans

Patsarawadee Paojinda<sup>1</sup>, Napat Pimsiri<sup>1</sup>, Nunthawadee Niamnuy<sup>1</sup>,  
Piya Wongyanin<sup>1</sup>, Pramoon Arooncharus<sup>1</sup>, Nittiya Chowchaikong<sup>2</sup>,  
Ranida Tuanudom<sup>3</sup>, Waranya Imprasittichai<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology,  
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

<sup>2</sup>Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Pathum Thani

<sup>3</sup>Preclinic Health Science Center, Faculty of Medicine,  
Bangkokthonburi University, Bangkok

<sup>4</sup>Department of Basic Medical Science, Faculty of Medicine Vajira hospital,  
Navamindradhiraj University, Bangkok

\*Corresponding author email: patsarawadee.pa@bsru.ac.th

Received: 19 February 2023

Revised: 19 June 2023

Accepted: 1 July 2023

### Abstract

Peroxidases (E.C.1 . 1 1 . 1 . 7 ) are commonly found in natural oxidoreductases and can oxidize with various reactants such as guaiacol, pyrogallol, etc. It is popular for use in immunology research, as well as the treatment of phenolic compounds in wastewater, peroxides elimination from raw materials in the food industry, and as biosensor. The objectives of this research were to compare the amino acid sequences and biochemical properties of peroxidase in plants, yeast, bacteria and humans in 7 types including *Arabidopsis thaliana*, *Armoracia rusticana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas*, and *Saccharomyces cerevisiae* from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). The software of the

ExPASy SIB Bioinformatics SOPMA tool was used to analyze the physicochemical data by comparing similarities among protein chains, while the ClustalW software was used to analyze the phylogenetic relationships. The lengths of amino acid sequences for peroxidase in plants, yeast, bacteria, and humans were found to be in the ranges of 58 – 352, theoretical pI 4.72-8.76, negative charge (Asp + Glu) 2-45, positive charge (Arg + Lys) 3-32, extinction coefficient 8980-32680, instability index 26.05-59.62, and grand average of hydropathicity (GRAVY) -0.442-0.190. In the comparison of amino acid sequences for peroxidase among *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas*, and *Saccharomyces cerevisiae*, the highest percent identity was found in *Arabidopsis thaliana* at 65.70%. In the analysis of the phylogenetic relationships, short phylogenetic branches were found in 4 living things including *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, and *Ipomoea batatas*, indicating close phylogenetic relationships. The results from this study provide insight into the role of peroxidase in the development of enzymatic engineering to promote the potential of industry, medicine, and bioremediation.

**Keywords:** peroxidase / amino acid sequences / bioinformatics

## บทนำ

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์รูปแบบซับนิตเดี่ยว (monomeric) ที่มีฮีมีเป็นองค์ประกอบ จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ 28-240 กิโลดาลตัน [1] สามารถพบในสิ่งมีชีวิต เช่น พืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ เพอร์ออกซิเดสแบ่งได้ 2 กลุ่มคือ (1) Heme peroxidase ประกอบด้วย (1.1) Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamily (PCOXS) จัดอยู่ในกลุ่ม Animal peroxidase ประกอบด้วย Myeloperoxidases, Eosinophil peroxidase, Lactoperoxidase และ Thyroid peroxidases เป็นต้น (1.2) Peroxidase-Catalase Superfamily (PCATS) จัดอยู่ในกลุ่ม Non-animal peroxidase จำแนกเป็น Class I prokaryote peroxidase (Cytochrome-peroxidase, Ascorbate-peroxidase, Catalase-peroxidase เป็นต้น) Class II secretory fungal peroxidase (Lignin peroxidase) และ Class III secretory plant peroxidase [2] (Horseradish peroxidase, Soybean peroxidase, peanut peroxidase เป็นต้น) (2) Non-heme peroxidase ประกอบด้วย Thiol peroxidase, Halo-Peroxidase, Alkylhydro-Peroxidase และ NADH-Peroxidase [3] แสดงให้เห็นถึงกลุ่มของเอนไซม์ Myeloperoxidase ที่พบในมนุษย์ที่จัดอยู่ในเพอร์ออกซิเดสกลุ่ม Heme peroxidase เช่นเดียวกับพืช ยีสต์ และแบคทีเรีย

เพอร์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งการสลายสารตั้งต้นด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และออกซิโดซสารตั้งต้นที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน [4] เพอร์ออกซิเดสเป็นส่วนหนึ่งในเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และมีความสำคัญในธรรมชาติ [3] จากรายงานวิจัยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันเพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากฮอสมเรดิช (Horseradish; HRP) ได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพิ่มขึ้นเป็นผลจากประโยชน์ในการนำมาใช้ทั้งด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ พบว่า HRP เป็นพืชตระกูลกะหล่ำพบบนแถบชายฝั่งทะเลยุโรป ในประเทศไทยหากนำ HRP มาใช้ประโยชน์จะมีต้นทุนที่สูงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ รายงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเพอร์ออกซิเดสในพืช และยังเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่เจริญ และดำรงอยู่อย่างไม่ซับซ้อน เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ โดยพบเพอร์ออกซิเดสในมนุษย์มากกว่า 30 ชนิดที่แตกต่างกันออกไป [5]

เพอร์ออกซิเดสที่พบในพืชเกี่ยวข้องข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช และมีความสำคัญในด้านยา ชีวเคมี ภูมิคุ้มกัน เทคโนโลยีชีวภาพ และอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย สามารถพบได้ในลูกพลัม (*Spondias tuberosa* A.) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เลมอน (*Citrus jambhiri*,

*Citrus limon*) ท้อ (*Prunus persica*) ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) มะละกอ (*Carica papaya*) ปาล์มขวด (*Roystonea regia*) มะเดื่อฟาโรห์ (*Ficus sycomorus*) กระถิน (*Leucaena leucocephala*) ผักร็อคเก็ต (*Eruca vesicariasis* bsp. *Sativa*) มะงั่ว (*Citrus medica*) สตรอว์เบอร์รี่ (*Fragaria ananassa* Duch) บรอกโคลี (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) กีวี (*Actinidia deliciosa*) ต้นชา (*Camellia sinensis*) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ปาล์มกั๊กหันลมจีน (*Trachycarpus fortunei*) มะเขือยาว (*Solanum melongena*) บัควีท (*Fagopyrum esculentum*) ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) ถั่วเขียว (*Vigna species*) กะหล่ำ (*Brassica oleracea*) บวบหอม (*Luffa aegyptiaca*) มันเทศ (*Ipomoea batatas*) และถั่วเหลือง (*Glycine max*) [3,6,7] ส่วนใหญ่เพอร์ออกซิเดสจากพืชจัดอยู่ใน Class III secretory plant peroxidase ที่หลั่งออกมาออกเซลล์หรือสามารถขนส่งไปแวคิวโอลได้ [8] พบใน PeroxiBase database จำนวน 5692 sequence ประมาณร้อยละ 70 เป็น sequence ของ non-animal peroxidase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญ เช่น การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ (cell wall metabolism) พบว่าเพอร์ออกซิเดสเป็นหนึ่งในหลายเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการย่อยสลายผนังเซลล์ [9] Lignification, suberization, auxins metabolism, wound healing, reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitro gen species (RNS) metabolism [3]

HRP ก็จัดอยู่ใน Class III มีหลายไอโซเอนไซม์น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 31-40 กิโลดาลตัน และค่า pi ตั้งแต่ 5.7-9.6 [4] โครงสร้างประกอบด้วยส่วนบริเวณเร่ง มักเรียกว่า heme group และโครงสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 308 ตัว [10] ปัจจุบันได้รับความนิยมนสูงในงานการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ จึงมีรายงานวิจัยศึกษาความสัมพันธ์เพอร์ออกซิเดสจากลำดับกรดอะมิโน และคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพวิเคราะห์ผ่านเครื่องมือชีวสารสนเทศ สร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต (Phylogenetic tree) จากผลรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเพอร์ออกซิเดส Class III เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความเสถียรมากที่สุด [11] ปัจจุบันมีการรายงานการวิจัยที่มุ่งเน้นการศึกษาเกี่ยวกับลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นจำนวนมาก โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิต ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่การวิจัยขั้นสูงทางด้านต่าง ๆ เช่น HRP เป็นเอนไซม์เฉพาะสำหรับกระตุ้นให้ยาออกฤทธิ์ในการรักษามะเร็ง (specific enzyme-prodrug therapies) โดยคอนจูเกตส์ HRP กับ แอนติบอดีที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งและออกซิโดซ์ indole-3-acetic acid ไม่ทำให้เกิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ลดการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ [12]

จากการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานและการประยุกต์ใช้เพอร์ออกซิเดสพืชต้นแบบในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการโคลนโมเลกุลทำให้สามารถแยกและกำหนดลักษณะเฉพาะของยีนหลายตัว [13] เพอร์ออกซิเดสของ *Arabidopsis thaliana* จัดอยู่ใน Class III พบมากถึง 130 ไอโซเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างลำดับ RNA และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRP พบโครงสร้างของยีนที่คล้ายกันร้อยละ 75 [4] รายงานการวิจัยได้ศึกษาการกระจายสายวิวัฒนาการของ Catalase-peroxidase (CP; EC 1.11.1.6) จำนวน 1839 sequences ที่ รายงานใน PeroxiBase database จัดอยู่ใน Class I prokaryote peroxidase มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับ oxidative stress [3] พบมากในแบคทีเรียรูปแบบเอนไซม์สองหน้าที่ทำงานทั้ง catalase และ peroxidase ด้วยการทำงานเช่นนี้ทำให้ CP จากแบคทีเรียสามารถป้องกันการเกิด oxidative stress [14]

ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส 7 ชนิดที่มีการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากการศึกษาข้อมูลจากพืชต้นแบบ (*Arabidopsis thaliana*) เป็นต้นแบบของการศึกษาเช่นเดียวกับแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ประกอบกับข้อมูลสนับสนุนมีเพียงพอในฐานข้อมูล เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบพืชในท้องถิ่นที่ปลูกและเจริญเติบโตง่ายในประเทศไทย เช่น *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Ipomoea batatas* (มันเทศ) เพื่อทดแทนการใช้ HRP ในงานวิจัยต่อไป อีกทั้งยังมีความสนใจในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงทางคุณสมบัติทางเคมีของพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ รวม 7 ชนิด ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* (พืชต้นแบบ), *Armoracia rusticana* (ฮอสแรดิซ), *Escherichia coli* (แบคทีเรีย), *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Homo sapiens* (มนุษย์), *Ipomoea batatas* (มันเทศ), *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์) โดยผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสนับสนุนสำหรับการศึกษาวิจัยต่อไป อาทิ โครงสร้างสามมิติ บริเวณเร่งของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการผลิตตัวติดฉลากกับแอนติบอดีต่อไป การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่เป็นบริเวณเร่งและความเสถียรของเอนไซม์ในการผลิตตัวติดฉลากกับแอนติบอดี อาจใช้เทคนิคทางชีวเคมีและชีววิทยาเชิงโครงสร้าง ซึ่งการศึกษาด้านนี้จะช่วยในการเข้าใจโครงสร้างและคุณสมบัติของเอนไซม์เชิงลึก และอาจช่วยในการพัฒนาและการปรับใช้เอนไซม์ในการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นไปในอนาคต

## วัสดุและวิธีการ

สืบค้นข้อมูลพื้นฐานเพอร์ออกซิเดส โดยสืบค้นข้อมูลพื้นฐานเพอร์ออกซิเดส จาก *Armoracia rusticana* (ฮอสมแรดิช), *Arabidopsis thaliana* (พืชต้นแบบ), *Escherichia coli* (แบคทีเรีย), *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Homo sapiens* (มนุษย์), *Ipomoea batatas* (มันเทศ) และ *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์) จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) (ตารางที่ 1) พิจารณาสีสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา ทั้ง 7 ชนิดจากความสามารถพบกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในห้อยปฏิบัติการ และจัดอยู่ในกลุ่ม Heme peroxidase

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของ peroxidase enzyme จาก 7 สิ่งมีชีวิต

	Definition	DBsource accession	Source
1	Horseradish peroxidase	"A00740.1"	<i>Armoracia rusticana</i>
2	peroxidase	"Q42578"	Thale cress
3	peroxidase	"CP024134.1"	<i>Escherichia coli</i>
4	peroxidase	"NM001251386.1"	Soybean
5	myeloperoxidase	"X64647.1"	Human
6	peroxidase	"AJ242742.1"	Sweet potato
7	glutathione peroxidase GPX2, partial	"JAAEAL010000016.1"	Baker's yeast

หมายเหตุ

1 = *Armoracia rusticana*

2 = *Arabidopsis thaliana*

3 = *Escherichia coli*

4 = *Glycine max*

5 = *Homo sapiens*

6 = *Ipomoea batatas*

7 = *Saccharomyces cerevisiae*

วิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเคมี-กายภาพ ข้อมูลทางเคมี-กายภาพของ amino acid sequences วิเคราะห์ด้วย Expert Protein Analysis System (ExPASy) [15] ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) โดยนำลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา เข้าระบบวิเคราะห์ออนไลน์ คำนวณ pI น้ำหนักโมเลกุล (kDa)



**เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มเดียวกัน (Multiple alignment sequence)** นำลำดับกรดอะมิโนเพอร์ออกซิเดสจาก *Homo sapiens* (มนุษย์), *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์), *Escherichia coli* (แบคทีเรีย), *Arabidopsis thaliana* (พืชต้นแบบ), *Armoracia rusticana* (ฮอสแรดิช), *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Ipomoea batatas* (มันเทศ) เปรียบเทียบพอลิเพปไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันด้วยโปรแกรม ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [16-18]

**วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ** ลำดับกรดอะมิโนเพอร์ออกซิเดสจาก *Homo sapiens* (มนุษย์), *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์), *Escherichia coli* (แบคทีเรีย), *Arabidopsis thaliana* (พืชต้นแบบ), *Armoracia rusticana* (ฮอสแรดิช), *Glycine max* (ถั่วเหลือง), *Ipomoea batatas* (มันเทศ) เปรียบเทียบและคำนวณแบบแผนวิวัฒนาการ และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) [19-20]

### ผลการศึกษา

**การวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเคมี-กายภาพ** วิจัยนี้ได้เปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางเคมี-กายภาพ ลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสกลุ่ม Heme-peroxidase ที่พบในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ในการสืบค้นข้อมูลโครงสร้างปฐมภูมิของลำดับกรดอะมิโนเพอร์ออกซิเดสจากฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI พบโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันโดยมีความยาวของลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 58-352 ตัว พบความยาวของลำดับกรดอะมิโน *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas* และ *Saccharomyces cerevisiae* เท่ากับ 309, 335, 299, 352, 58, 327 และ 162 ตามลำดับ Theoretical pI 4.72-8.76, Total number of negatively charged residues (Asp + Glu) 2-45, Total number of positively charged residues (Arg + Lys) 3-32, extinction coefficient 8980-32680, Instability index 26.05-59.62 และ Grand average of hydropathicity (GRAVY) - 0.442-0.190 ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์โดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่องมือ [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)

	1	2	3	4	5	6	7
Number of amino acids	309	335	299	352	58	327	162
MW (kDa)	34.0	35.0	33.1	38.1	6.4	35.0	18.4
Theoretical pI	6.30	4.72	5.25	4.98	8.15	5.30	8.76
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu)	28	23	45	31	2	23	19
Total number of positively charged residues (Arg + Lys)	27	15	32	23	3	18	23
Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$ , at 280 nm	13450	8980	32680	14940	25230	10470	16190
Instability index	42.94	35.91	41.43	31.74	59.62	39.23	26.05
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.177	0.126	-0.329	0.004	0.190	-0.109	-0.442

หมายเหตุ

1 = *Armoracia rusticana*

2 = *Arabidopsis thaliana*

3 = *Escherichia coli*

4 = *Glycine max*

5 = *Homo sapiens*

6 = *Ipomoea batatas*

7 = *Saccharomyces cerevisiae*

**การวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิ** การเปรียบเทียบกรดอะมิโนในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ทั้งหมด 7 ชนิด พบกรดอะมิโนที่มีจำนวนมากที่สุดใน *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas* และ *Saccharomyces cerevisiae* คือ Leucine (Leu) 35 (ร้อยละ 11.3), Serine (Ser) 45 (ร้อยละ 13.4), Alanine (Ala) Glycine (Gly) 29 (ร้อยละ 9.7), Leucine (Leu) 41 (ร้อยละ 11.6), Alanine (Ala) 9 (ร้อยละ 15.5), Serine (Ser) 35 (ร้อยละ 10.7) และ Lysine (Lys) 22 (ร้อยละ 13.6) ตามลำดับ ในทางตรงข้ามกรดอะมิโนที่พบน้อยในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา คือ Tryptophan (Trp) ใน 5 จาก 7 ชนิดที่ทำการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสจากพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Ala</b>	23 (7.4%)	30 (9.0%)	29 (9.7%)	27 (7.7%)	9 (15.5%)	24 (7.3%)	3 (1.9%)
<b>Arg</b>	21 (6.8%)	10 (3.0%)	17 (5.7%)	16 (4.5%)	3 (5.2%)	15 (4.6%)	1 (0.6%)
<b>Asn</b>	27 (8.7%)	31 (9.3%)	10 (3.3%)	30 (8.5%)	0 (0.0%)	34 (10.4%)	8 (4.9%)
<b>Asp</b>	21 (6.8%)	17 (5.1%)	20 (6.7%)	22 (6.2%)	0 (0.0%)	16 (4.9%)	9 (5.6%)
<b>Cys</b>	8 (2.6%)	9 (2.7%)	4 (1.3%)	9 (2.6%)	5 (8.6%)	8 (2.4%)	4 (2.5%)
<b>Gln</b>	13 (4.2%)	14 (4.2%)	10 (3.3%)	15 (4.3%)	4 (6.9%)	15 (4.6%)	11 (6.8%)
<b>Glu</b>	7 (2.3%)	6 (1.8%)	25 (8.4%)	9 (2.6%)	2 (3.4%)	7 (2.1%)	10 (6.2%)
<b>Gly</b>	17 (5.5%)	26 (7.8%)	29 (9.7%)	26 (7.4%)	4 (6.9%)	24 (7.3%)	13 (8.0%)
<b>His</b>	3 (1.0%)	3 (0.9%)	10 (3.3%)	4 (1.1%)	3 (5.2%)	4 (1.2%)	0 (0.0%)
<b>Ile</b>	13 (4.2%)	21 (6.3%)	12 (4.0%)	16 (4.5%)	1 (1.7%)	14 (4.3%)	7 (4.3%)
<b>Leu</b>	35 (11.3%)	36 (10.7%)	25 (8.4%)	41 (11.6%)	6 (10.3%)	32 (9.8%)	15 (9.3%)
<b>Lys</b>	6 (1.9%)	5 (1.5%)	15 (5.0%)	7 (2.0%)	0 (0.0%)	3 (0.9%)	22 (13.6%)
<b>Met</b>	5 (1.6%)	3 (0.9%)	8 (2.7%)	6 (1.7%)	0 (0.0%)	4 (1.2%)	2 (1.2%)
<b>Phe</b>	20 (6.5%)	19 (5.7%)	15 (5.0%)	23 (6.5%)	1 (1.7%)	21 (6.4%)	13 (8.0%)
<b>Pro</b>	17 (5.5%)	12 (3.6%)	9 (3.0%)	17 (4.8%)	6 (10.3%)	16 (4.9%)	5 (3.1%)

<b>Ser</b>	25 (8.1%)	45 (13.4%)	14 (4.7%)	29 (8.2%)	3 (5.2%)	35 (10.7%)	14 (8.6%)
<b>Thr</b>	25 (8.1%)	27 (8.1%)	15 (5.0%)	26 (7.4%)	1 (1.7%)	31 (9.5%)	6 (3.7%)
<b>Trp</b>	1 (0.3%)	1 (0.3%)	4 (1.3%)	1 (0.3%)	4 (6.9%)	1 (0.3%)	1 (0.6%)
<b>Tyr</b>	5 (1.6%)	2 (0.6%)	7 (2.3%)	6 (1.7%)	2 (3.4%)	3 (0.9%)	7 (4.3%)
<b>Val</b>	17 (5.5%)	18 (5.4%)	21 (7.0%)	22 (6.2%)	4 (6.9%)	20 (6.1%)	11 (6.8%)

หมายเหตุ

1 = *Armoracia rusticana*

2 = *Arabidopsis thaliana*

3 = *Escherichia coli*

4 = *Glycine max*

5 = *Homo sapiens*

6 = *Ipomoea batatas*

7 = *Saccharomyces cerevisiae*

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ด้วยโปรแกรม Clustal W จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสระหว่าง *Armoracia rusticana* และ *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas*, *Saccharomyces cerevisiae* พบค่า percent identity (%identity) สูงที่สุดใน *Arabidopsis thaliana* ร้อยละ 65.70 ในทางตรงข้ามผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสระหว่าง *Armoracia rusticana* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบค่า percent identity (%identity) ต่ำที่สุด คือ ร้อยละ 12.35 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของ peroxidase 7 สิ่งมีชีวิต

	1	2	3	4	5	6	7
1	100	65.70	12.50	56.96	15.52	52.75	12.35
2	65.70	100	12.50	52.44	18.97	53.21	12.35
3	12.50	12.50	100	11.90	13.79	11.90	11.11
4	56.96	52.44	11.90	100	13.79	60.55	11.73
5	15.52	18.97	13.79	13.79	100	15.52	13.79
6	52.75	53.21	11.90	60.55	15.52	100	12.96
7	12.35	12.35	11.11	11.73	13.79	12.96	100

หมายเหตุ

1 = *Armoracia rusticana*

2 = *Arabidopsis thaliana*

3 = *Escherichia coli*

4 = *Glycine max*

5 = *Homo sapiens*

6 = *Ipomoea batatas*

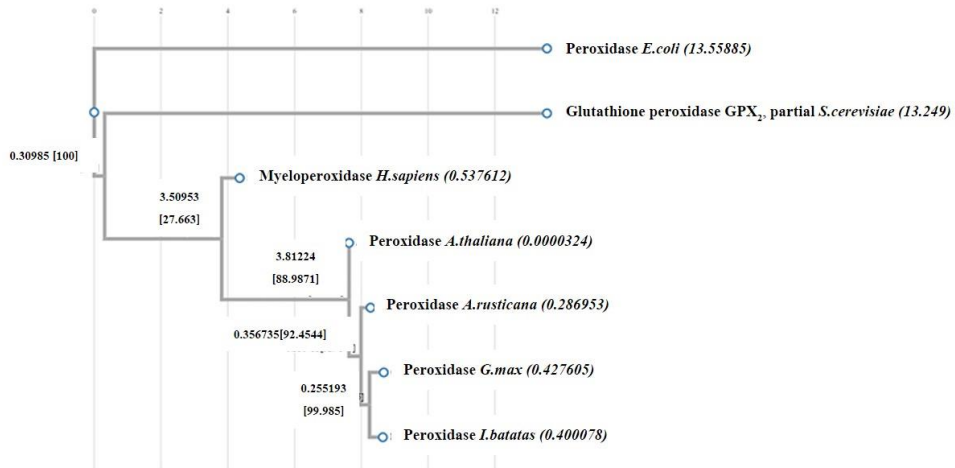
7 = *Saccharomyces cerevisiae*

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มเพอร์ออกซิเดสเดียวกัน (Multiple alignment sequence) ผลการนำลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสจาก *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max*, *Homo sapiens*, *Ipomoea batatas* และ *Saccharomyces cerevisiae* จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่าบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันมี 1 บริเวณเท่านั้น และบริเวณที่มีกรดอะมิโนคล้ายกันจำนวน 3 บริเวณ ดังภาพที่ 1

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ทั้ง 7 ชนิด พบว่า *Arabidopsis thaliana* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Armoracia rusticana* มีความคล้ายกันของกรดอะมิโนถึง ร้อยละ 65.70 และยังพบ *Glycine max* และ *Ipomoea batatas* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน และถูกจัดในกลุ่มเดียวกัน ดังภาพที่ 2

<i>A. thaliana</i>	MGFSPSFSCSAIGALILGCLLLQASNSNAQLRPFYFGTCTFVFDIIGNIIVDELQTDPR
<i>Horseradish</i>	-----MQLTPTFYDNSCP NVSNIVRDTIVNELRSDPR
<i>G. max</i>	---MGSMLLVVALLCAFAMHAGFSVSYAQLTPTFYRETCPNLFPIVFGVIFDASFTDPR
<i>I. batatas</i>	-----MASFSPLLAMALAI FIFSSHSNAQLSSTFYSTTCP NVSAIVRTVVQQALQNDAR
<i>H. sapiens</i>	-----PSCASRWHLW-----
<i>E. coli</i>	-----MSQTVHFQGNPVTVANSIPQAGSKAQFTTLVAKDLSDV
<i>S. cerevisiae</i>	-----MTTSFYDLECKDKKGESFKFDQLKGKVVLI VNVASK
.	
<i>A. thaliana</i>	IAASLLRLHFHDCFVRGCDASILLDN-STSFRTKDAAPNANSARGFNVIDRMKVALERA
<i>Horseradish</i>	IAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDN-TTSFRTEKDAFGNANSARGFPVIDRMKAAVESA
<i>G. max</i>	IGASLMRLHFHDCFVQGCDSVLLNN-TDTIESEQDALPNINSIRGLDVVNDIKTAVENS
<i>I. batatas</i>	IGGSLIRLHFHDCFVDGCDGSLLLDNNGTIVSEKDALPNTNSTRGFDVVNDIKTAVENA
<i>H. sapiens</i>	-----LCYIILG-----AAQHR
<i>E. coli</i>	TLSQFAGKRKVLNIFPSIDTGVCAAS---VRKFNQLATEIDNTVVLCISADLPFAQSRF
<i>S. cerevisiae</i>	CGFTPQYKELEELYKKYQDKGFVILG-----FPCNQFGKQEPGSDEQITEFCQLNYGVT
.	
<i>A. thaliana</i>	CPGRVSCADILTIASQISVLLSGGPWWVPKGRRDSVEAFFALANTALPSPFFNLTQLKT
<i>Horseradish</i>	CPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAFDLANANLPAPFFTLPQLKD
<i>G. max</i>	CPDPTVSCADILAI AAEIASVLLGGGPGWPVPLGRRDSL TANRTLANQNL PAPPFNLTQLKA
<i>I. batatas</i>	CPGVVSCVDILALASESSVSLAGGPSWVNLGRRDRRTANQGGANTSLPSPFFENLTNLQ
<i>H. sapiens</i>	CP-----
<i>E. coli</i>	CGAEGLN NVITLSTFRNAEFLQAYG-----
<i>S. cerevisiae</i>	FPIMKKIDVNGSNADSVYNYLKSQK-----
.	
<i>A. thaliana</i>	AFADVGLNRTSDLVALSGGHTFGRAQCQFVTPRLYNFNGTNSPDPSPLYPTYLVELRRLCP
<i>Horseradish</i>	SFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFTMDRLYNFNSNTGLPDPTLNTTYLQTLRGLCP
<i>G. max</i>	SFAVQGLN-TLDLVTLSGGHTFGRARCSTFINRLYNFNSNTGNPDPTLNTTYLEVLRARCP
<i>I. batatas</i>	KFTNVGLN-VNDLVALSGAHTFGRAQCRTFSPRLFNFSNTGNPDPTLNTTYLATLQQICP
<i>H. sapiens</i>	-----ASPEYPWAQCPWVFP-----
<i>E. coli</i>	-----VAIADGPKGLAARAVVVIDE-----
<i>S. cerevisiae</i>	-----AGLLGFKGIKWNFEKFLVDSN-----
.	
<i>A. thaliana</i>	QNGNGTVLVNFDVVTDAFDSQYYTNLRNGKGLIQSDQELFSTP-GADTIPLVNQYSSDM
<i>Horseradish</i>	LNGNLSALVDFDLRTP TIFDNKYVNLEEQKGLIQSDQELFSSPNATD T I PLVRSFANST
<i>G. max</i>	QATGDNL TNLDLSTPDQFDNRYYSNLLQLNGLLQSDQELFSTP-GADTIPIVNSFSSNQ
<i>I. batatas</i>	QGGSGFTVTNLDPPTPDTFDNNYFNLQTNRGLLQSDQELFSTS-GAPTIAIVNNFSANQ
<i>H. sapiens</i>	-----
<i>E. coli</i>	-----
<i>S. cerevisiae</i>	-----
.	
<i>A. thaliana</i>	SVFFRAFIDAMIRMGNI RPLTGTQGEIRQNCRVVNPRIRVVENDDGVVSSI-----
<i>Horseradish</i>	QTFNNAFVEAMDRMGNITPLTGTQGIIRLNCRVVNSNS-----
<i>G. max</i>	NTFFSNFRVSMIKMGNIGVLTGDEGEIRLQCNFVNGDSFGLASVASKDAKQLVAQSK
<i>I. batatas</i>	TAFFESFVQSMINMGNISPLTGSNGEIRSNCRREN-----
<i>H. sapiens</i>	-----LQVLVGERGCVQHAAATG-----
<i>E. coli</i>	-----SDNVI FSQLVDEITTEPDYEAALAVLKA-----
<i>S. cerevisiae</i>	-----GKVVQRFSSITKPSLQDEIQSLLSK-----

ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเพอร์ออกซิเดสกลุ่มเดียวกันด้วยโปรแกรม ClustalW วิเคราะห์คุณลักษณะhomology sequence โดยแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน (: ด้วยพื้นหลังสีชมพู, บริเวณที่มีกรดอะมิโนคล้ายกัน (.) ด้วยพื้นหลังสีฟ้า และบริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนเหมือนกันเลยจะไม่ปรากฏสีของพื้นหลัง



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพอร์ออกซิเดสจากพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ วิเคราะห์โดยโปรแกรม ClustalW

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเพอร์ออกซิเดสถูกคำนวณพารามิเตอร์ด้วย Expert Protein Analysis System (ExpASY) พบว่ามีค่า Theoretical pI ตั้งแต่ 4.72-8.76 ค่าเฉลี่ย hydropathicity (GRAVY) ตั้งแต่ -0.442-0.190 และมีน้ำหนักโมเลกุล 6.4-38.1 kDa จากผลการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์แสดงให้เห็นว่า ค่า Theoretical pI ที่ต่ำกว่า 7 ส่งผลให้โปรตีนมีประจุลบ (negatively charge) คุณสมบัติเป็นกรดในขณะที่ ค่า Theoretical pI ที่สูงกว่า 7 ส่งผลให้โปรตีนมีประจุบวก (positively charge) คุณสมบัติเป็นด่างหรือเบส ซึ่งสอดคล้องกับค่า Total number of negatively charged residues (Asp + Glu) และ Total number of positively charged residues (Arg + Lys) พบเพอร์ออกซิเดสจาก *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Glycine max* และ *Ipomoea batatas* มีคุณสมบัติของโปรตีนที่เป็นกรด แต่เพอร์ออกซิเดสจาก *Homo sapiens* และ *Saccharomyces cerevisiae* คุณสมบัติของโปรตีนที่เป็นด่าง ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากลุ่ม Heme peroxidase เดียวกัน แต่หากมาจากแหล่งที่แตกต่างกันก็ทำให้คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพแตกต่างกันออกไป [11] ค่า Grand average of hydropathicity (GRAVY) ที่เป็นลบของเพอร์ออกซิเดสจาก *Armoracia rusticana*, *Escherichia coli*, *Ipomoea batatas* และ *Saccharomyces cerevisiae* บ่งชี้ว่าโปรตีนเพอร์ออกซิเดสทั้ง 4 ชนิดไม่มีขั้วส่งผลให้เป็นเพอร์ออกซิเดสจากสิ่งมีชีวิตทั้ง 4 ละลายน้ำได้

ยาก (hydrophobic) คุณสมบัติดังกล่าวนี้เป็นบทบาทสำคัญด้านความเสถียรของโปรตีนในโครงสร้างสามมิติของเพอร์ออกซิเดส [21]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการช่วยประเมินช่วงเวลาของความแตกต่างลำดับกรดอะมิโน สายพันธุ์ของเพอร์ออกซิเดสจากพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ แสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการที่เด่นชัดของเพอร์ออกซิเดส กลุ่ม Heme peroxidase ผลการวิเคราะห์แสดงถึงความยาวของกิ่งวิวัฒนาการที่สั้นในสิ่งมีชีวิต 4 ชนิด ได้แก่ *Armoracia rusticana*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* และ *Ipomoea batatas* เมื่อเทียบกับ *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ส่งผลให้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันจัดอยู่ใน PCATS: Class III secretory plant peroxidase ในทางตรงข้ามเพอร์ออกซิเดสจาก *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Homo sapiens* จัดอยู่ใน PCATS: Class I และ PCOXS ตามลำดับ [3]

การศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพืช ยีสต์ แบคทีเรีย และมนุษย์ ช่วยสนับสนุนความเชื่อมโยงของกลุ่มย่อยเพอร์ออกซิเดสที่จัดอยู่ใน Heme peroxidase ด้วยคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ แสดงให้เห็นว่าเพอร์ออกซิเดสต่างกลุ่มและมีที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อโครงสร้างหน้าที่แตกต่างกันออกไป ผลการศึกษานี้ช่วยให้มีความเข้าใจถึงข้อมูลเพอร์ออกซิเดสที่จะไปมีบทบาทในการพัฒนาวิศวกรรมเอนไซม์ที่ส่งเสริมศักยภาพในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ และกระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพ

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณการสนับสนุนการวิจัยจากสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

### เอกสารอ้างอิง

1. Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 2001;42(5):462-8.
2. O'Brien PJ. Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions* 2000;129(1-2):113-39.
3. Pandey VP, Awasthi M, Singh S. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem* 2017;6(1):308.



4. Krainer FW, Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:1611-25.
5. Flohe L, Ursini F. Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(9):1485-90.
6. Rompel A, Albers M, Naseri JI, Gerdemann C, Büldt-Karentzopoulos K, Jasper B, et al. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochim Biophys Acta* 2007;1774(11):1422-30.
7. Henriksen A, Mirza O, Indiani C, Teilum K, Smulevich G, Welinder KG, et al. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci* 2001;10(1): 108-15.
8. Welinder KG. Superfamily of plant fungal and bacterial peroxidase. *Curr Opin Struct Biol* 1992;2(3):388-93.
9. Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 2004;9(11):534-40.
10. Welinder KG. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett* 1976;72(1):19-23.
11. Chauhan V, Kumari V, Kanwa SS. Comparative analysis of amino acid sequence diversity and physiochemical properties of peroxidase superfamily. *J Protein Res Bioinform* 2020;2(003):1-8.
12. Spadiut O, Rossetti L, Dietzsch C, Herwig C. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expr Purif* 2012;86(2):89-97.
13. Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 2002;288(1-2):129-38.
14. Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, et al. Peroxibase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 2007;68(12):1605-11.

15. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res* 2021;49(W1):216-27.
16. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatic* 2007;23(21):2947-48.
17. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25(24):4876-82.
18. Sievers F, Higgins DG. The Clustal Omega Multiple Alignment Package. *Methods Mol Biol* 2021;2231:3-16.
19. Ajawatanawong P. Sequence analysis: from sequence to information [internet]. Bangkok; 2010 [updated 2010 Feb 1; cited 2021 Oct 13] Available from: <http://thaibioinfonetwork.blogspot.com/2010/02/sequence-analysis-from-sequence-to.html>
20. Hillis DM. Phylogenetic analysis. *Curr Biol* 1997;7(3):129-31.
21. Dutta B, Banerjee A, Chakraborty P, Bandopadhyay R. In silico studies on bacterial xylanase enzyme: Structural and functional insight. *J Genet Eng Biotechnol* 2018;16(2):749-56.