

# 洋紫荊胰蛋白酶抑制劑對胰蛋白酶抑制作用之動力學研究

## Kinetic Studies of the Inhibitory Effects of a *Bauhinia purpurea* Trypsin Inhibitor on Trypsin

洪志宏<sup>\*1</sup> Chih-Hung Hung  
元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

王海龍<sup>2</sup> Hai-Lung Wang  
元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology,  
Yuanpei University of Medical Technology.

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology,  
Yuanpei University of Medical Technology.

(Received May 16, 2016; Revised January 23, 2017; Accepted February 22, 2017)

**摘要：**植物蛋白酶抑制劑是一種天然的抗蟲防禦性蛋白，藉由抑制昆蟲消化道絲胺酸蛋白酶的活性，抑制幼蟲的生長和發育。在腫瘤抑制，抗寄生蟲和抗生素方面，植物蛋白酶抑制劑具有潛在的應用價值。本研究是從豆科植物洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)種子中，利用硫酸銨分割(70-90%)、Sephadex G-50 膠體分離管柱、DEAE cellulose 陰離子交換樹脂及 Trypsin-Sepharose 親和性色層分析法，可純化出洋紫荊胰蛋白酶抑制劑(*Bauhinia purpurea* trypsin inhibitor, BPTI)，以 12% SDS-PAGE 分析，由單一條多肽鏈組成，分子量約 20 kDa，屬於 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑；對胰蛋白酶活性的抑制作用莫耳數比為 1:1。利用 Lineweaver-burk double reciprocal plot 及 Dixon plots 研究其動力學特性，結果顯示 BPTI 對胰蛋白酶活性的抑制是屬於競爭性抑制作用，抑制常數(inhibition constant,  $K_i$ )為  $3.82 \times 10^{-8}$  M。

**關鍵詞：**洋紫荊、Kunitz-type 蛋白酶抑制劑、抑制常數

---

\*Corresponding author



**Abstract:** Plant protease inhibitors have been studied to determine their mechanism of action against serine proteinases. Such inhibitors also participate in diverse biological activities, including plant storage, cancer protection, parasite inhibition, and bacterial inhibition. Moreover, they form a critical group of defense proteins in plants because of their ability to inhibit serine proteinase digestive enzymes from insects, thereby suppressing larval growth and development. This study presents a Kunitz-type trypsin inhibitor purified from *Bauhinia purpurea* seeds. The purification procedure involved by 70%–90% ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50 column, DEAE ion-exchange column chromatography, and trypsin-Sepharose 4B affinity chromatography. A molecular weight of 20 kDa and a single polypeptide chain were estimated by 12 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Kinetic studies demonstrated that the inhibitory effect of BPTI on trypsin can be categorized as competitive inhibition, with the inhibition constant  $K_i$  being  $3.82 \times 10^{-8}$  M.

**Keywords:** Kunitz-type trypsin inhibitor, *Bauhinia purpurea*, inhibition constant

## 壹、前言

在農業上，蟲害威脅是破壞農作物生產力的主要因素之一，儘管廣泛使用化學殺蟲劑但他們仍然嚴重減少農作物產量<sup>1</sup>。許多植物藉由製造防禦性化合物對抗害蟲<sup>2</sup>，大部分保護性物質是蛋白質，其中一種植物防禦機制是製造消化酵素抑制劑干擾害蟲的消化系統<sup>3</sup>，這種機制是累積一種或幾種防禦蛋白質如蛋白酶抑制劑， $\alpha$ 澱粉酶抑制劑，凝集素和 *arcelins*<sup>4</sup>。蛋白酶抑制劑是最廣泛研究的天然抗蟲害防禦機制，具有抑制害蟲蛋白酶活性及改善食品的營養價質<sup>5</sup>。這些蛋白酶抑制劑會使得害蟲的腸道內的消化蛋白酶失去活性，卻很少抑制內源性(endogenous)蛋白酶，因此證明了他們可參與保護植物防止害蟲<sup>6,7</sup>。蛋白酶抑制劑通常存在於植物的貯藏器官如種子，累積的量可達儲存組織總可溶性蛋白約 1~10%。在豆科植物，蛋白酶抑制劑在種子成熟期間大量累積，無論是在貯藏蛋白的累積和在植物防禦作用上，都扮演著重要角色<sup>8</sup>。

各種消化蛋白酶，包括絲胺酸(serine)，半胱胺酸(cysteine)，天門冬胺酸(aspartic acid)和金屬蛋白酶的抑制劑，已在植物中被確認<sup>9</sup>。從豆科植物種子分離絲胺酸蛋白酶抑制劑通常含有兩種主要類型，Bowman-Birk-type (分子量約 8~16 kDa)，具有七對雙硫鍵及對胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的兩個反應位置(reactive sites)，和 Kunitz-type (分子量約 20~25 kDa)，具有一對或兩對雙硫鍵和對胰蛋白酶作用的單一個反應位置<sup>10,11</sup>。

研究植物界的蛋白酶抑制劑，主要以豆科(Leguminosae)，茄科(Solanaceae)及禾本科(Gramineae)為主要的題材。它們透過抑制昆蟲消化道的蛋白酶活性，減少其消化能力，因此阻止其生長發育<sup>12</sup>。蛋白酶抑制劑隨著食物進入昆蟲消化道和阻止蛋白質的消化，因此，昆蟲無法獲得胺基酸和能量，導致生長發育遲緩<sup>13</sup>。這些蛋白酶抑制劑單一的防禦基因已經從一種植物轉殖到另一個植物，並可因受傷誘導它們表現或因組成型啟動子(constitutive



promoter)而恆定表現，對害蟲傷害具有明顯的效果。轉移不同來源的蛋白酶抑制劑的基因至具有經濟利益的植物，結果轉殖基因植物對害蟲捕食更具耐受性<sup>14</sup>。首先由 Hilder 等人證實，透過轉殖豇豆(*Vigna unguiculata*)胰蛋白酶抑制劑基因到煙草中，使得菸草具有抵抗多種害蟲，包括鱗翅目(Lepidopterans)，如棉鈴蟲(Heliothis)和夜蛾科(Spodoptera); 鞘翅目(Coleopterans),如葉甲(Diabrotica)，Anthonomous 和直翅目(Orthoptera)如蝗蟲(Locusts)<sup>15</sup>。為了進一步拓展植物防禦基因的病蟲害防治應用，新的和具有潛力的昆蟲特異性抑制蛋白和基因，需要從不同的植物來源分離。

洋紫荊屬於豆目(Leguminosae)、蘇木科(Caesalpinaceae)，學名：*Bauhinia purpurea* Linn.，形態特徵：落葉喬木。單葉互生，由頂端深裂成心形，7-12 公分長，約等寬，全緣；總狀花序頂生或腋生；於晚秋或早冬開花；花萼管狀，單側開裂成佛焰苞狀；花瓣 5 片，粉紅色；有藥雄蕊 3-4 枚；莢果扁平，約 20-30 公分長。我們實驗室已從洋紫荊種子純化出一種 Kunitz type 胰蛋白酶抑制劑(BPTI)，由單一多肽鏈組成，分子量約 20 kDa 的蛋白質，屬於 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑<sup>16</sup>，本研究是進一步探討洋紫荊胰蛋白酶抑制劑對胰蛋白酶抑制作用的動力學之研究。

## 貳、研究方法

### 一、BPTI 的分離和純化<sup>16</sup>

洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)種子收集於新竹元培醫事科技大學校園中，稱取種子 100 克，洗淨並除去雜質，浸泡於 1 公升 0.01 M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液中，4 °C 下靜置過夜。隔天於 4 °C 的冰箱內，進行下列步驟：用均質機打成漿狀，靜置 2-3 小時，以萃取 BPTI。用 Beckman J2-21 M/E 冷凍離心機，在 4 °C 10,000 rpm (JA-14 rotor)離心 20 分鐘，紗布過濾上清液，上清液慢慢加入固體硫酸銨至 70%濃度，待沈澱生成穩定之後，以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，再加入硫酸銨至 90%濃度，10,000 rpm 離心 20 分鐘，將沈澱物用少許蒸餾水溶解後，移置透析袋，於 4°C 下，對 0.1M 醋酸 3 公升透析，每隔 12 小時更換透析液，共更換 4 次透析液。透析後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘除去不溶之雜質，取上清液通入以 0.01 M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 Sephadex G-50 (2.7 × 100 公分)，以磷酸鹽緩衝液沖洗，以分液收集器每 3 毫升收集一管，測其波長為 280nm 的吸收可得二個吸收峰，經活性分析得知第二個吸收峰具有活性。將具有活性部分收集並通入預先以 0.01M Tris-HCl pH 8.0 緩衝液平衡過的 DEAE cellulose 管柱(4.5 × 10 公分)，以含 0 到 0.3 M 氯化鈉的 0.01M Tris-HCl pH 8.0 緩衝液梯度沖洗，可得一個蛋白吸收峰並具有活性，將有活性部分收集，對蒸餾水透析，每隔 12 小時更換透析液，共更換 4 次透析液。調整蛋白液的 pH 至 8 左右，12,000 rpm 離心 15 分鐘，將上清液通過先以 0.01 M，pH 8.0 磷酸鹽緩衝液平衡過的 Trypsin-Sepharose-4B affinity column (2.2 × 10 公分)，以含 0.1M 氯化鈉的 0.01 M，pH 8.0 磷酸鹽緩衝液沖洗，將非特異性結合的蛋白質除去，最後用 0.01 N HCl 溶液沖洗，可得一個蛋白吸收峰，此即所欲純化的 BPTI，其純度可由 12% SDS-PAGE 決定。



## 二、BPTI 抑制胰蛋白酶活性測定<sup>17</sup>

實驗組是將 0.5 毫升溶於 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 緩衝溶液中的定量 BPTI 與 0.5 毫升 trypsin 溶液(10mg/ml)混合均勻, 置於 37°C 5 分鐘後, 再加入 4 微升 BAPNA (N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide)溶液(50mg/ml), 37°C反應 20 分鐘後, 加入 0.5 毫升 10 %醋酸溶液終止反應, 測定 410 nm 吸收。對照組則以 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液代替 BPTI 溶液, 其餘步驟與實驗組相同。空白組是以 0.5 毫升 BPTI 溶液(實驗空白組)或 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液 (對照組空白組)依序加入 0.5 毫升 trypsin 溶液, 0.5 毫升 10%醋酸溶液, 再加入 4 微升 BAPNA 溶液, 測定 410 nm 的吸光。所有的實驗都重複做三次。BPTI 抑制能力的計算方法可以用殘餘酶活性(residual trypsin activity, 簡稱 R.T.A.)或以抑制百分比(percent inhibitor, 簡寫為%I)來表示。抑制單位的定義: 抑制 1 毫克胰蛋白酶所需的抑制劑量, 謂之 1 抑制單位 (inhibition unit), 計算公式如下:

$$\text{R.T.A.(\%)} = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_4} \times 100\%$$

$A_1$ =實驗組之  $A_{410}$  nm

$A_2$ =對照組之  $A_{410}$  nm

$A_3$ =實驗空白組  $A_{410}$  nm

$A_4$ =對照空白組  $A_{410}$  nm

$I(\%) = 1 - \text{R.T.A.}(\%)$

## 三、蛋白質濃度的定量

蛋白質定含量是根據 Bradford 的方法<sup>18</sup>, 利用 Coomassie Blue G250 染色來決定, 在 595 nm 吸收波長下測定。牛血清白蛋白 (1 毫克/毫升) 作為蛋白質標準物。

## 四、SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS-PAGE)

利用 12 % 的 SDS-PAGE 來分析蛋白質。而蛋白質則用 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 染色來偵測。

## 五、動力學分析

不同濃度的 BPTI ( $0.8 \times 10^{-8}$  和  $1.6 \times 10^{-8}$  M), 在 0.01M pH 8.0 Tris-HCl 的緩衝液下, 先與 trypsin (0.3 mg/ml) 37°C反應 10 分鐘後, 分別再加入 0.3125, 0.625, 1.25 及 2.5mM 的受質 BAPNA, 反應 10 分鐘, 之後使用 Lineweaver-burk double reciprocal plot, 並以反應速率的倒數  $1/V$  ( $\text{OD}_{410}/\text{h/ml}$ )<sup>-1</sup> 對受質濃度的倒數  $1/S$  作圖, 畫出雙倒數圖來決定其抑制胰蛋白酶的作用方式。接著, 再以 Dixon plot 作圖<sup>19</sup>, 在不同濃度下的 BAPNA (0.5 mM 和 1 mM), 以反應速率的倒數  $1/V$  ( $\text{OD}_{410}/\text{h/ml}$ )<sup>-1</sup> 對不同濃度的 BPTI 作圖, 所畫出的兩條直線交叉點的值, 即為 BPTI 對胰蛋白酶的抑制常數( $K_i$ )。



## 參、實驗結果

### 一、洋紫荊胰蛋白酶抑制劑(BPTI)之純化

BPTI 的純化方法是藉由硫酸銨鹽分割、Sephadex G-50 管柱、DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂管柱及 Trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱，可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的吸收峰。接著利用 12% SDS-PAGE 分析，可得知 BPTI 分子量約為 20 kDa 屬於 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑（圖 1）。

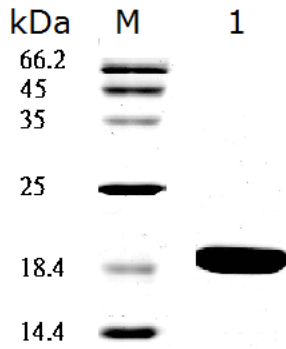


圖 1 利用 12% SDS-PAGE 電泳分析。Lane M: 標準蛋白質分子量，Lane 1: 注入 15 毫克純化的 BPTI，分子量約 20 kDa。

### 二、BPTI 抑制胰蛋白酶的濃度效應

由圖 2 顯示不同量 BPTI 對定量胰蛋白酶的活性抑制情形。當 BPTI 與胰蛋白酶莫耳數的比值為 1 時，胰蛋白酶的殘留酵素活性為零，可知胰蛋白酶與 BPTI 作用的莫耳數比為 1: 1。

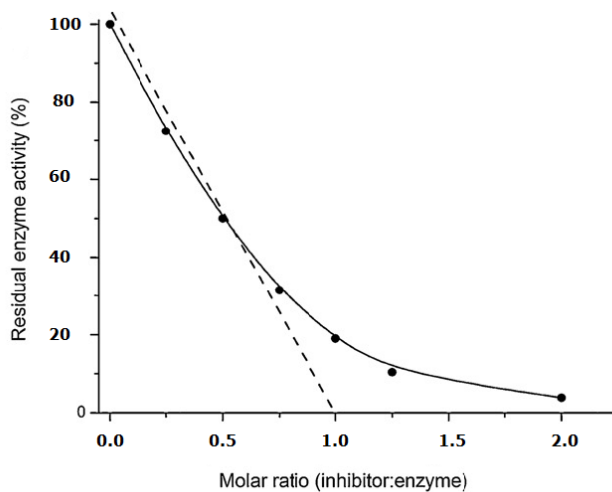


圖 2 BPTI 對胰蛋白酶抑制作用的活性分析。不同濃度的 BPTI 與固定濃度的 trypsin，在 37 °C 反應 5 分鐘，再加入 4 $\mu$ l BAPNA 溶液(50mg/ml)，37°C 反應 20 分鐘後，加入 0.5 ml 10% 醋酸溶液終止反應，抑制程度由測定 410 nm 吸收值而定。

### 三、動力學分析

在 0.01M Tris-HCl，pH8.0 緩衝溶液下，以不同濃度之 BPTI 處理一定量的胰蛋白酶，37 °C 反應 10 分鐘後，再分別加入不同濃度的受質 BAPNA，反應 10 分鐘，使用 Lineweaver-burk double reciprocal plot 作圖，以反應速率的倒數  $1/V$  ( $OD_{410}/h/ml$ )<sup>-1</sup> 對受質濃度的倒數  $1/S$  作圖 (圖 3)，這些直線方程式相交於 y 座標，可知 BPTI 對 Trypsin 的抑制作用是影響其 Michaelis 常數( $K_m$ )，隨著 BPTI 的濃度增加，trypsin 對受質的  $K_m$  值變大，但對其最大反應速率不影響，因此顯示 BPTI 對 Trypsin 的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用(competitive inhibition)。

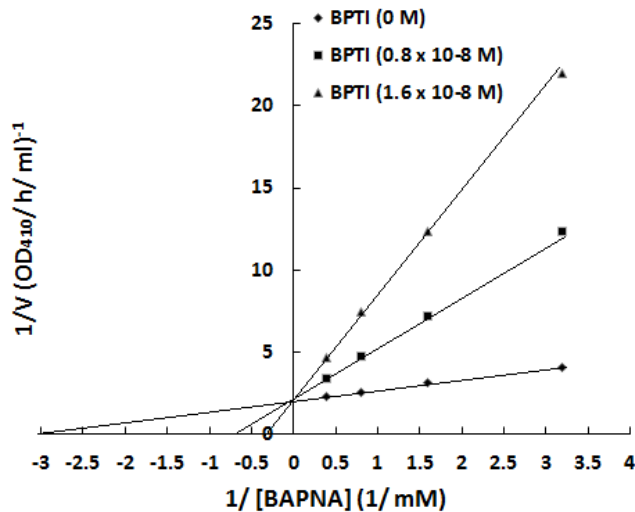


圖 3 酵素動力學的分析(Lineweaver-burk double reciprocal plot)。

不同濃度的 BPTI ( $0.8 \times 10^{-8}$  和  $1.6 \times 10^{-8}$  M)，在 0.01M pH 8.0 Tris-HCl 的緩衝液下，先與 trypsin (0.3 mg/ml) 37°C 反應 10 分鐘後，分別再加入 0.3125, 0.625, 1.25 及 2.5 mM 的受質 BAPNA，反應 10 分鐘，之後使用 Lineweaver-burk double reciprocal plot，並以反應速率的倒數  $1/V$  ( $OD_{410}/h/ml$ )<sup>-1</sup> 對受質濃度的倒數  $1/S$  作圖

接著，利用 Dixon plot 在兩種不同 BAPNA 濃度下，決定 BPTI 與 trypsin 的抑制常數( $K_i$ )，以反應速度的倒數( $OD_{410}/h/ml$ )<sup>-1</sup> 對不同的 BPTI 濃度作圖。兩條直線方程式相交點數值即為 BPTI 與胰蛋白酶之抑制常數( $K_i$ )，其值為  $3.82 \times 10^{-8}$  M (圖 4)。



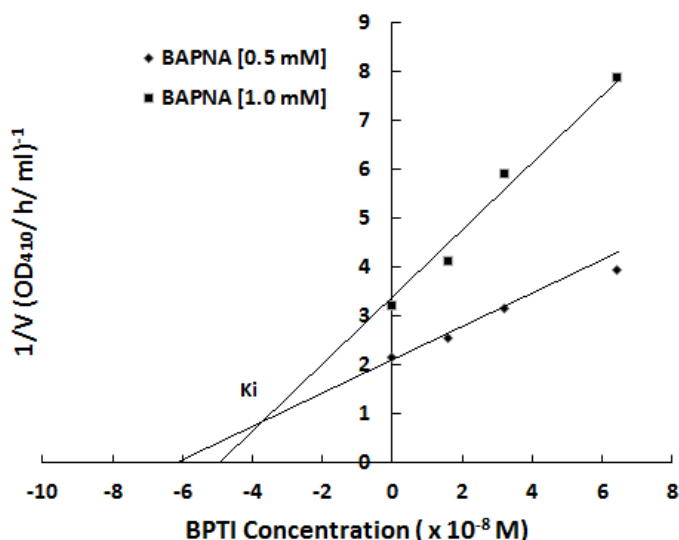


圖 4 利用 Dixon plot 決定 BPTI 對胰蛋白酶的抑制常數(Ki)。在不同濃度的 BPTI 下，使用不同受質 BAPNA 濃度(0.5 和 1.0 mM)下抑制胰蛋白酶活性，以反應速率的倒數  $1/V$  ( $OD_{410}/h/ml$ ) $^{-1}$  對 BPTI 的濃度作圖所畫出的兩條直線方程式，相交點的值即為 BPTI 對胰蛋白酶的抑制常數(Ki)。

## 肆、討論

胰蛋白酶抑制劑是一類天然的抗蟲物質，在植物中抗蟲基因佔有十分重要的角色，同時也是研究蛋白質結構，特別是一級結構與其功能關係的良好模型，而且胰蛋白酶抑制劑在生理上具有重要調解作用，在腫瘤抑制方面有潛在應用價值，因此尋找新型的、高活性的胰蛋白酶抑制劑具有重要的應用價值。蛋白酶抑制劑廣泛的存在動物、植物和微生物中，植物中的蛋白酶抑制劑可參與種子休眠過程中內源性蛋白酶活性的調節、可作為儲藏蛋白、保護植物免受真菌和昆蟲的侵蝕。另外動物體內的諸多生理生化反應，如血液凝固、腫瘤細胞生長分化、愛滋病毒的傳染等都與蛋白酶抑制劑有密切相關。因此，蛋白酶抑制劑成為近幾年生命科學研究的一個熱門的題材<sup>20-23</sup>。

絲胺酸蛋白酶抑制劑對胰蛋白酶具有很高的親和性抑制作用，主要以競爭性(competitive)或非競爭性(non-competitive)抑制作用。動力學分析顯示，BPTI 對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用，與台灣欒樹(KFTI)<sup>24</sup>、*Pithecellobium dumosum*<sup>20,25,26</sup>、*Archidendron ellipticum*<sup>27</sup>、*Derris trifoliata*<sup>28</sup>、*Putranjiva roxburghii*<sup>29</sup> 所純化的 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑機制相同；相對地，也有其他 Kunitz type 胰蛋白酶抑制劑屬於非競爭性的抑制作用，如 *Adenanthera pavonina*<sup>20</sup>、*Caesalpinia bonduc*<sup>31</sup> 及 *Tamarindus indica*<sup>32</sup>。利用 Dixon plot 作圖求得 BPTI 對胰蛋白酶的 Ki 值為  $3.82 \times 10^{-8}$  M，對胰蛋白酶具有很高的親和性，其 Ki 值與其他的 Kunitz-type 胰蛋白酶抑制劑有相似的數值，如，如 EAKTI (Ki  $1.75 \times 10^{-9}$  M)<sup>33</sup>、PmTKI (Ki  $1.5 \times 10^{-9}$  M)<sup>34</sup>、



PdKI-4 (Ki  $5.7 \times 10^{-10}$  M)<sup>20</sup> 及 TfgKTI (Ki  $3.01 \times 10^{-9}$  M)<sup>35</sup> 及 KFTI 為  $1.78 \times 10^{-9}$  M<sup>24</sup>。

## 參考文獻

1. Boulter, D., "Insect Pest Control by Copying Nature Using Genetically Engineered Crops," *Biochemistry*, Vol. 34, 1993, pp. 1452-1466.
2. Katoch, R. and Thakur, N., "RNA Interference: a Promising Technique for Improvement of Neglected Crops," *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 64, 2013, pp.248-259.
3. Katoch, R., Sethi, A., Thakur, N., Murdock, L. L., "RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 169, 2013, pp. 1579-1605.
4. Furstenberg-Hagg, J., Zagrobelny, M. and Bak, S., "Plant Defense Against Insect Herbivores," *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.14, 2013, pp.10242-10297.
5. Bhattacharjee, C., Prasad, D. T., Manjunath, N. H., Sanyal, D. and Zarga, S. M., "Exploring Plant Proteinase Inhibitors," *Genomics and Applied Biology*, Vol. 3, 2012, pp.8-21.
6. Laskowski, M. and Kato, I., "Protein Inhibitors of Proteinases," *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 49, 1980, pp. 593-626.
7. Laskowski, M., Kato, I., Kohr, W. J., Park, S. J., Tashino, M. and Whatley, H. S., "Positive Darwinian Selection in Evolution of Protein Inhibitors of Serine Proteinases," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 52, 1988, pp.545-553.
8. Zhu, C., Luo, N., He, M., Chen, G., Zhu, J., Yin, G., Li, X., Hu, Y., Li, J. and Yan, Y., "Molecular Characterization and Expression Profiling of the Protein Disulfide Isomerase Gene Family in *Brachypodium distachyon L.*," *PLoS One*, Vol. 9, 2014, pp. e94704.
9. Heitz, T., Geoffroy, P., Fritig, B. and Legrand, M., "The PR-6 Family: Proteinase Inhibitors in Plant Microbe and Plant Insect Interactions," In: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.), *Pathogenesis — Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, 1999, pp. 131-155.
10. Laskowski, M. and Qasim, M. A., "What can the Structures of Enzyme-inhibitor Complexes Tell Us about the Structures of the Enzyme Substrate Complexes?" *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1477, 2000, pp.324-337.
11. Peyachoknagul, S., Matsui, T., Shibata, H., Hara, S., Ikenaka, T., Okada, Y. and Ohno, T., "Sequence and Expression of the mRNA Encoding the Chymotrypsin Inhibitor in Winged Bean (*Psophocarpuste tragonolobus (L.) DC.*)," *Plant Molecular Biology*, Vol. 12, 1989, pp. 51-58.
12. Delano-Frier, J. P., Castro-Guillen, J. L. and Blanco-Labra, A., "Recent Findings on the Multifaceted Functionality of Enzyme Inhibition by Natural Compounds: a review," *Current Enzyme Inhibition*, Vol. 4, 2008, pp.121-152.
13. Ryan, C. A., "Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and





- Pathogens," *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 28, 1990, pp.425-449.
14. Altpeter, F., Diaz, I., McAuslan, H., Gaddour, K., Carbonero, P. and Vasil, I.K., "Increased Insect Resistance in Transgenic Wheat Stably Expressing Trypsin Inhibitor CMe," *Molecular Breeding*, Vol. 5, 1999, pp.53-63.
  15. Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F. and Boulter, D. A., "Novel Mechanism of Insect Resistance Engineered into Tobacco," *Nature*, Vol. 300, 1987, pp.160-163.
  16. Hung, C. H., Dong, C. F., Chen, Y. F., Chou, H. Y., Huang, C. Y. and Wang, H. L., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Bauhinia purpurea* Seeds," *Journal of Yuanpei University*, Vol. 17, 2010, pp. 17-28 °.
  17. Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. and Macedo, M. L. R., "Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds," *Journal of Protein Chemistry*, Vol. 20, 2001, pp. 625-632.
  18. Bradford, M. M., "Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding," *Analytical Biochemistry*, Vol.72, 1976, 248-254.
  19. Dixon, M., "The Determination of Enzyme Inhibitor Constants," *Biochemical Journal*, Vol. 55, 1953, pp. 170-171.
  20. Hung, C. H., Wu, C. C. and Wang, H. L., "Inhibition of Invasion in Human Colon Adenocarcinoma Cells by *Acacia confusa* Trypsin Inhibitor," *Journal of Health Management*, Vol. 12, 2014, pp. 49-60.
  21. Rufino, F. P., Pedroso, V. M., Araujo, J. N., França, A. F., Rabêlo, L. M., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E. A., Franco, O. L. and Oliveira, A. S., "Inhibitory Effects of a Kunitz-type Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) Seeds Against Insect-pests' Digestive Proteinases," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 63, 2013, pp. 70-76.
  22. Xu, Y., Qin, X., Zhou, J., Tu, Z., Bi, X., Li, W., Fan, X. and Zhang, Y., "Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Inhibits the Growth and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Inactivated in Human Hepatocellular Carcinoma," *Oncology Letters*, Vol. 2, 2011, pp. 779-783.
  23. Lee, S. H., Kim, H. J., Han, H. J., Li, M., Kwak, S. H. and Park, S., "Urinary Trypsin Inhibitor Attenuates Lipopolysaccharide-induced Neutrophil Activation," *Korean Journal of Anesthesiology*, Vol. 63, 2012, pp. 540-546.
  24. Hung, C. H., Dong, C. H. and Wang, H. L., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Koelreuteria formosana* Seeds," *Journal of Health Management*, Vol. 1, 2015, pp. 1-12.
  25. Oliveira, A. S., Migliolo, L., Aquino, R. O., Ribeiro, J. K., Macedo, L. L., Andrade, L. B., Bemquerer, M. P., Santos, E. A., Kiyota, S. and de Sales, M. P., "Purification and Characterization of a Trypsin-papain Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds and its *in vitro* Effects Towards Digestive Enzymes from Insect Pests," *Plant Physiology and Biochemistry*,



- Vol. 45, 2007, pp. 858-865.
26. Oliveira, A. S., Migliolo, L., Aquino, R. O., Ribeiro, J. K., Macedo, L. L., M. Bemquerer, P., Santos, E. A., Kiyota, S. and de Sales, M. P., "Two Kunitz-type Inhibitors with Activity Against Trypsin and Papain from *Pithecellobium dumosum* Seeds: Purification, Characterization, and Activity Towards Pest Insect Digestive Enzyme," *Protein and Peptide Letters*, Vol. 16, 2009, pp. 1526-1532.
  27. Bhattacharyya, A., Mazumdar, S., Leighton, S. M. and Babu, C. R., "A Kunitz Proteinase Inhibitor from *Archidendron ellipticum* Seeds: Purification, Characterization, and Kinetic Properties," *Phytochemistry*, Vol. 67, 2006, pp. 232-241.
  28. Bhattacharyya, A. and Babu, C. R., "Purification and Biochemical Characterization of a Serine Proteinase Inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into Structural and Antimalarial Features," *Phytochemistry*, Vol. 70, 2009, pp. 703-712.
  29. Chaudhary, N. S., Shee, C., Islam, A., Ahmad, F., Yernool, D., Kumar, P. and Sharma, A. K., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Putranjiva roxburghii* Seeds," *Phytochemistry*, Vol. 69, 2008, pp. 2120-2126.
  30. Macedo, M. L., de Sa, C. M., Freire, M. D. and Parra, J. R., "A Kunitz-type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from *Adenanthera pavonina* L. Seeds and its Effect on *Callosobruchus maculatus*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 2004, pp. 2533-2540.
  31. Bhattacharyya, A., Rai, S. and Babu, C. R., "A Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor from *Caesalpinia bonduc* Seeds: Isolation, Partial Characterization and Insecticidal Properties," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 45, 2007, pp. 169-177.
  32. Araujo, C. L., Bezerra, I. W., Oliveira, A. S., Moura, F. T., Macedo, L. L., Gomes, C. E., Barbosa, A. E., Macedo, F. P., Souza, T. M., Franco, O. L., Bloch, J. C. and Sales, M. P., "In vivo Bioinsecticidal Activity Toward *Ceratitidis capitata* (Fruit Fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea Weevil) and in vitro Bioinsecticidal Activity Toward Different Orders of Insect Pests of a Trypsin Inhibitor Purified from Tamarind tree (*Tamarindus indica*) Seeds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, pp. 4381-4387.
  33. Oliveira, C. F. R., Vasconcelos, I. M., Aparicioc, R., Freire, M. G. M., Baldasso, P. A., Marangonia, S. and Macedo, M. L. R., "Purification and Biochemical Properties of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) Seeds," *Process Biochemistry*, Vol. 47, 2012, pp. 929-935.
  34. Cruz, A. C. B., Massena, F. S., Migliolo, L., Macedo, L. L. P., Monteiro, N. K. B., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Uchoa, A. F., Grossi de Sá, M. F., Vasconcelos, I. M., Murad, A. M., Franco, O. L. and Santos, E. A., "Bioinsecticidal Activity of a Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Catanduba (*Piptadenia moniliformis*) Seeds," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 70, 2013, pp. 61-68.



35. Oddepally, R., Sriram, G. and Guruprasad, L., "Purification and Characterization of a Stable Kunitz Trypsin Inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seeds," *Phytochemistry*, Vol. 96, 2013, pp. 26-36.

