Ex@tas Online

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

Purificação e caracterização de um inibidor de tripsina de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca

Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca seeds

Luzia Aparecida Pando [1], Silvana Cristina Pando [2]

[1] Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Rua José Moreira Sobrinho s/n, 45206-190, Jequié, BA, Brasil

[2] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Av. Ranulpho Marques Leal, 3484,79620-080, Três Lagoas, MS, Brasil

Resumo

Inibidores de proteinases são proteínas ou peptídeos capazes de interagir específica e reversivelmente com enzimas proteolíticas e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Este trabalho teve como objetivos purificar e caracterizar um inibidor de tripsina de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca por cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O inibidor, nomeado PvTI, exibiu uma massa molecular aparente de 14 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e foi capaz de inibir tripsina bovina, mas não quimotripsina. O valor da constante de inibição (Ki) contra tripsina bovina foi 3,7 x 10^{-8} M. A sequência N-terminal do PvTI, GDDVKSA-CCDTCLCTKSEPPTCRCVDV, apresentou alta homologia com outros inibidores tipo Bowman-Birk. PvTI exerceu efeito fungistático sobre *Fusarium moniliforme* na concentração de 500 µg/mL.

Palavras-chave: PvTI, Bowman-Birk, *Fusarium*.

Abstract

Proteinase inhibitors are proteins or peptides capable of specifically and reversibly interact with proteolytic enzymes and are widely distributed in the plant kingdom. This study aimed the purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca seeds by ion exchange chromatography on DEAE- Sepharose and high performance liquid chromatography (HPLC). The inhibitor, named PvTI, exhibited an apparent molecular mass of 14 kDa in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and was capable to inhibit bovine trypsin, but not chymotrypsin. The value of the inhibition constant (Ki) against bovine trypsin was 3.7 x 10^{-8} M. The

N-terminal sequence of PvTI, GDDVKSA-CCDTCLCTKSEPPTCRCVDV, showed high homology with other Bowman-Birk type inhibitors. PvTI exerted fungistatic effect on *Fusarium moniliforme* at concentration of 500 µg/mL.

Keywords: PvTI, Bowman-Birk, *Fusarium*.

Introdução

Inibidores de proteinases são proteínas ou peptídeos, com massa molecular variando de 6 a 24 kDa, capazes de interagir específica e reversivelmente com enzimas proteolíticas e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente na família Fabaceae [1,2]. Podem ser encontrados em diferentes tecidos da mesma planta, sendo a maior concentração em sementes, onde representam 5 a 15% do conteúdo de proteínas totais [1,3]. Considerando as características de homologia da estrutura primária, massa molecular, conteúdo de resíduos de cisteína e especificidade inibitória, esses inibidores podem ser classificados em famílias de acordo com a classe de enzimas que inibem, sendo denominados inibidores de serinoproteinases, metaloproteinases, cisteinoproteinases, proteinases ácidas ou inibidores multifuncionais, sendo estes últimos capazes de inibir duas ou mais classes distintas de enzimas [4,5,6]. A classe de enzimas mais estudada e melhor caracterizada, do ponto de vista fisiológico, é das serinoproteinases de mamíferos que tem, como principais representantes, as enzimas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreínas [5,6]. A composição e a conformação do sítio reativo são determinantes na especificidade desses inibidores por uma classe particular de enzima permitindo, assim, a formação de um complexo específico e reversível entre enzima e inibidor [6,7].

As principais famílias de inibidores de serinoproteinases são Kunitz e Bowman-Birk, que são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas [1,6]. Destes, os primeiros inibidores de sementes a terem suas sequências de aminoácidos determinadas foram os inibidores de proteinases tipo Bowman-Birk, conhecidos como BBI, obtidos de feijão (*Phaseolus lunatus)* [8] e de soja (*Glycine max*) [9]. BBI podem apresentar um ou mais sítios reativos que possibilitam a interação destes com mais de uma molécula de enzima, por exemplo, tripsina e/ou quimotripsina, com massa molecular variando de 6 a 16 Kda, ressaltando a complexidade da via de sinalização e a importância evolutiva desses inibidores [10,11]. São extremamente estáveis, resistentes a variações de pH, temperatura e à proteólise por proteinases, sendo que essa estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e a outras interações não covalentes [5,6].

Esses inibidores de serinoproteinases podem desempenhar várias funções nas plantas, entre as quais, como proteínas de reserva e no mecanismo de defesa contra o ataque de insetos e fitopatógenos [2,12]. Entre estes fitopatógenos destacam-se, por exemplo, fungos do gênero *Fusarium*, que estão amplamente distribuídos na natureza e produzem proteinases extracelulares que desempenham um

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

papel ativo no desenvolvimento de doenças em muitas espécies de plantas de interesse econômico, entre as quais, sorgo, milho e a cana de açúcar [13,14]. A resposta de defesa da planta, induzida pelo ataque desses patógenos, envolve a síntese local de inibidores que podem suprimir a atividade dessas proteinases [1,15].

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família Fabaceae e constitui uma das principais fontes de proteínas na dieta humana, sendo muito consumido no Brasil. Embora represente uma fonte importante de proteínas e outros nutrientes, o feijão também apresenta uma grande quantidade de fatores antinutricionais que reduzem a digestão, dificultando, assim, a absorção de nutrientes essenciais para o organismo. Dentre esses fatores antinutricionais estão os inibidores proteolíticos, principalmente aqueles que inibem proteinases do tipo tripsina e quimotripsina [16,17]. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram purificar e caracterizar um inibidor de tripsina de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca.

Materiais e Métodos

Material biológico

As sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC carioca foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas – SP e o fungo *Fusarium moniliforme* foi obtido do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

Extração e purificação do inibidor

As sementes inteiras e maduras de *P. vulgaris* L. cultivar IAC carioca foram trituradas em um moinho analítico até a obtenção de um material pulverizado. A farinha das sementes (30 g) foi homogeneizada em solução de NaCl 0,15M 10% (p/v) e mantida sob agitação durante duas horas, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 6000 rpm durante 20 minutos a 4° C, filtrada, e o sobrenadante, após diálise e liofilização, foi o material utilizado na etapa de purificação.

O extrato bruto (5 ml) foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose (27 x 1,8 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. A eluição foi realizada com gradiente linear (tampão Tris-HCl 0,05 M/NaCl 0 - 0,5 M, pH 8,0) com um fluxo de 30 mL/h, sendo coletadas frações de 3 mL. Os ensaios para monitorar o inibidor foram realizados utilizando tripsina pancreática bovina ativa, tal como determinado por titulação fotométrica do sítio ativo por p-nitrofenil p'guanidinobenzoate-(NPGB), de acordo com Chase & Shaw [18]. As frações com atividade inibitória foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e utilizadas em uma etapa posterior de purificação em cromatografia líquida de fase reversa HPLC. O inibidor parcialmente purificado (500 μg) foi aplicado em uma coluna μ-Bondapack C18 (3,9 x 30 cm), equilibrada em solução de TFA 0,1%

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

em água filtrada no sistema milli Q (solvente A) e eluídos com TFA 0,1% em acetonitrila (solvente B). A absorbância foi monitorada em 280 nm. As frações com atividade inibitória foram liofilizadas para serem analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e para determinação da sequência N-terminal.

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford [19], utilizando BSA como padrão.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo o método descrito por Laemmli [20] em um sistema descontínuo com gel de separação 12,5%, pH 8,8 e gel de concentração 5%, pH 6,8. Os géis, depois de retirados das placas, foram corados com Coomassie brilliant blue R 250 durante 2 horas e descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água, na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

Sequenciamento amino terminal

A sequência amino terminal do PvTI foi determinada em um sequenciador automático de Edman [21] (modelo Applied Biosystems 477A). Os PTH (feniltiohidantoína) aminoácidos foram identificados em um analisador de aminoácidos modelo 120A, baseado no tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrão. A pesquisa da homologia foi realizada usando a base de dados SWISS-PROT.

Caracterização da atividade dos inibidores:

Medida da inibição sobre tripsina bovina

Para um volume final de 2,0 mL, a mistura de pré- incubação foi tampão Tris/HCl 12,5 mM, pH 8,0, tripsina 4,17 µg (dissolvida em HCl 1 mM) e diferentes concentrações dos inibidores. A pré-incubação ocorreu durante 10 minutos a 37º C. Decorrido o tempo descrito, o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA 0,5 mM) foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos a 37º C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio. A constante de inibição da tripsina bovina e do inibidor foi calculada assumindo-se o mecanismo de inibição do tipo "slow tight-binding" Morrison [22]. Os dados foram analisados no programa computacional Enziftter.

Ex@tas Online
ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

Estudo de inibição do crescimento micelial de *Fusarium moniliforme*

O ensaio foi realizado em placas de Petri (90 mm de diâmetro) com o inibidor de tripsina em meio BDA (batata, dextrose e aveia), com três repetições. O inibidor (500 μg) foi diluído em água esterilizada e a solução foi filtrada em filtro Millipore 0,22 μm em ambiente estéril. Posteriormente, esta solução foi adicionada ao meio quente (aproximadamente 70ºC) e foram vertidos 20 mL de meio por placa. Discos de 6 mm da cultura do fungo foram colocados sobre o meio solidificado. As placas foram mantidas a 28 ºC no escuro e foram feitas medições diárias. Quando o controle atingiu o diâmetro total da placa o experimento foi interrompido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto obtido de sementes maduras de *P. vulgaris* cultivar IAC Carioca, que apresentou atividade inibitória para tripsina pancreática bovina, foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose e o perfil cromatográfico pode ser analisado na figura 1. Foram obtidos três picos, sendo que o terceiro pico foi o que apresentou atividade inibitória para tripsina. Este material, após diálise e liofilização, foi aplicado em uma coluna de fase reversa $HPLC_{18}$, que resultou em quatro picos, sendo o pico majoritário, eluído com o tempo de aproximadamente 45 minutos, o que apresentou atividade de inibição, conforme mostrado na figura 2.

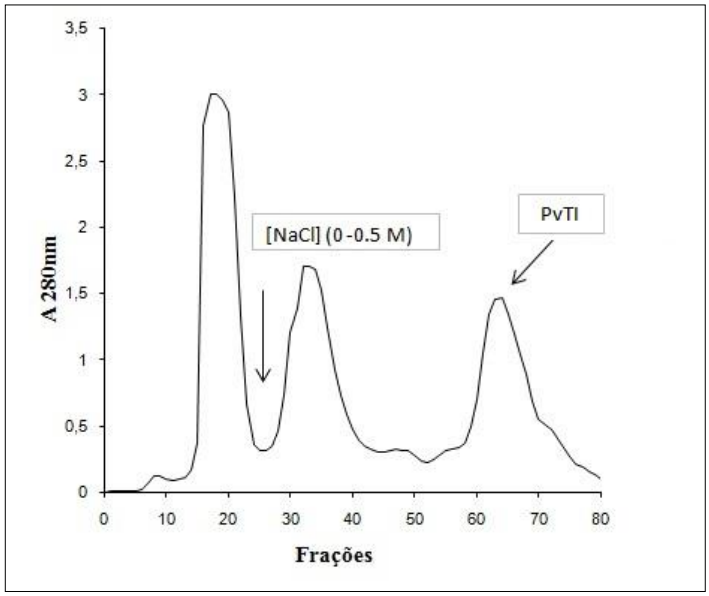

Figura 1. Cromatografia de troca iônica do extrato bruto em coluna de DEAE-Sepharose (1,8 x 27 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Fuxo de 30 ml/hora e eluição com um gradiente linear (tampão Tris-HCl 0,05 M/NaCl 0 - 0,5 M, pH 8,0).

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

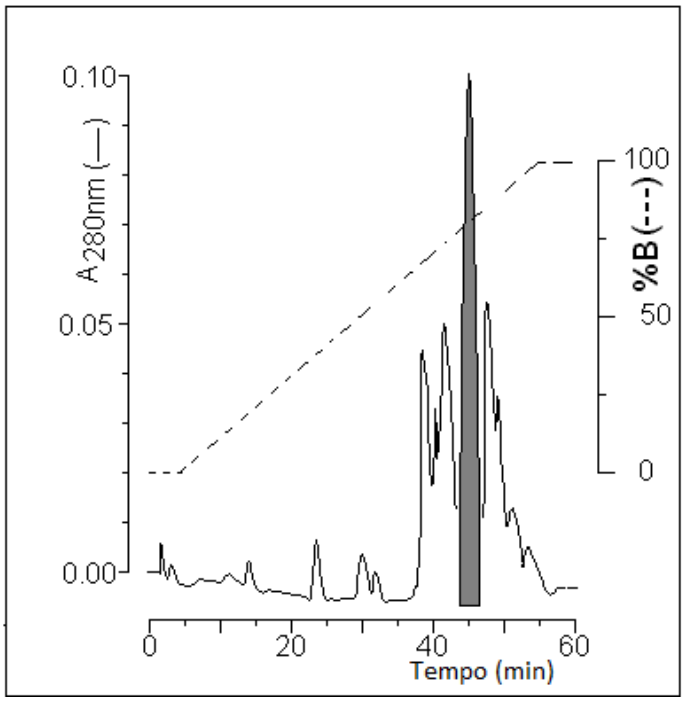

Figura 2. Cromatografia em fase reversa $HPLC_{18}$ da fração ativa da DEAE- Sepharose usando um gradiente linear de 0-100% de solvente B. Solvente A: 0.1% (v/v) TFA; solvente B: 66% (v/v) acetonitrila em solvente A. Fluxo: 1mL/min. As frações foram monitoradas a 280 nm.

Os procedimentos cromatográficos utilizados para purificação do inibidor foram satisfatórios, uma vez que a análise em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes) revelou a presença de uma única banda de massa molecular aproximadamente 14 kDa, para o inibidor denominado PvTI, conforme mostrado na figura 3. Além do acompanhamento do grau de purificação dos inibidores, a eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu determinar a massa molecular aparente do inibidor de tripsina. De acordo com o perfil eletroforético, pode-se observar que a massa molecular do PvTI foi mais alta do que valores encontrados na literatura para inibidores pertencentes à família Bowman-Birk, comumente denominados de BBI, que apresentam massa molecular variando de 8 a 10 kDa [11]. Por outro lado, inibidores BBI com massa molecular acima de 10 kDa foram relatados e purificados de sementes de *Cratylia mollis* [23] e *Phaseolus vulgaris* cv “Brown Kidney bean” [5].

Ex@tas Online
ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

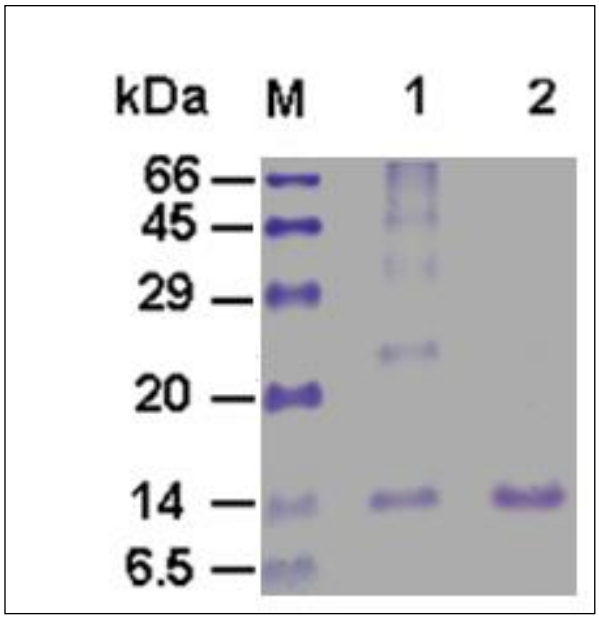

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%): M, marcadores de peso molecular: albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α-lactoalbumina (14 kDa); aprotinina (6,5 kDa). Linhas 1 e 2: 10 μg do material obtido da DEAE-Sepharose e fase reversa $HPLC_{18}$, respectivamente.

A sequência amino terminal, apresentada na figura 4, mostrou que PvTI está relacionado com a família Bowman Birk, visto que o mesmo apresentou 100% de homologia com a sequência amino terminal do inibidor BBI de Vicia *faba* [24] e alta homologia com os outros inibidores pertencentes a esta família, isolados de sementes de outras leguminosas como *Vicia angustifolia* [25]; *Glycine max* [26]; *Phaseolus vulgaris* [27] e *Pisum sativum* [28].

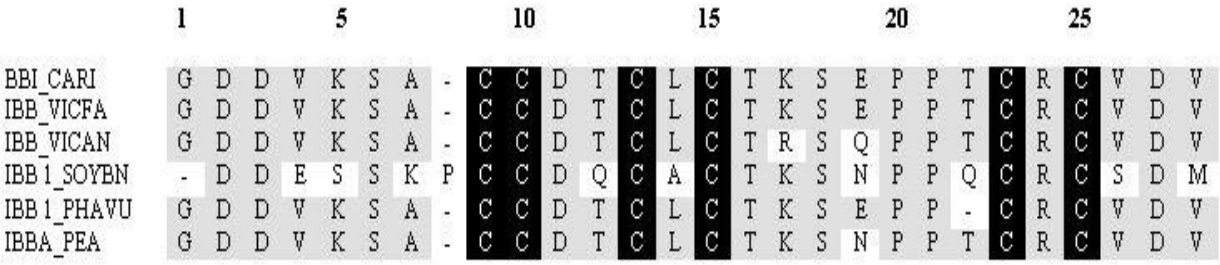

Figura 4. Comparação das seqüências N-terminal de inibidores Bowman-Birk. PvTI (BBI_CARI); IBB_VICFA (*Vicia faba*); IBB_VICAN (*Vicia angustifolia*); IBB1_SOYBN (*Glycine max*); IBB_PHAVU (*Phaseolus vulgaris*); IBBA_PEA (*Pisum sativum*). As sequências homólogas estão destacadas em cinza. Os resíduos de cisteína estão em preto. Alinhamento da seqüência múltipla com banco de dados SWISS-PROT.

Ex@tas Online
ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

Estudos de análise filogenética revelaram que inibidores de proteinases pertencentes à família Bowman-Birk, isolados de plantas leguminosas, são estruturalmente bem conservados, caracterizados pelo alto conteúdo de cisteína, com poucas diferenças durante sua evolução [29]. Estes dados indicam que existe uma relação entre as famílias de inibidores proteolíticos encontradas em sementes de leguminosas e o grau de evolução dessas plantas, onde os inibidores são mais frequentes na subfamília mais evoluída, a Faboideae [11, 29].

PvTI foi capaz de inibir tripsina bovina e a constante de dissociação do complexo foi medida pela determinação da atividade residual da enzima, após a incubação com diferentes concentrações do inibidor. O valor de Ki obtido, 3,7 x 10^{-8} M, indicou alta afinidade para tripsina, sendo essa especificidade comparada àquela de inibidores de tripsina isolados de *Cratylia mollis* [23], Phaseolus *vulgaris* cv "Brown Kidney bean" [5] e *Vicia faba* cv. Egypt **[**30]. O inibidor não foi capaz de inibir quimotripsina bovina, assim como inibidores BBI isolados de sementes de *Cratylia mollis* [23] e *Lupinus albus* [31].

Os inibidores de proteinases possuem um papel relevante no mecanismo de defesa contra fitopatógenos [2,12]. Os resultados preliminares, apresentados na figura 5, mostraram que PvTI exerceu efeito fungistático sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Fusarium moniliforme* e provocou alterações em sua morfologia. Lopes et al. [32] isolaram inibidores de tripsina de sementes de *Acacia plumosa* que foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichum sp* e *Fusarium moniliforme*. Resultados similares foram obtidos por Ye et al.[33], com um inibidor de tripsina e quimotripsina tipo Bowman-Birk isolado de *Vicia faba*, que apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Botrytis cinerea.* De acordo com Lopes et al. [32], o mecanismo de ação pode estar relacionado com a inibição de serinoproteinases que são liberadas para o meio durante o processo de nutrição desses fungos, o que impede o seu desenvolvimento.

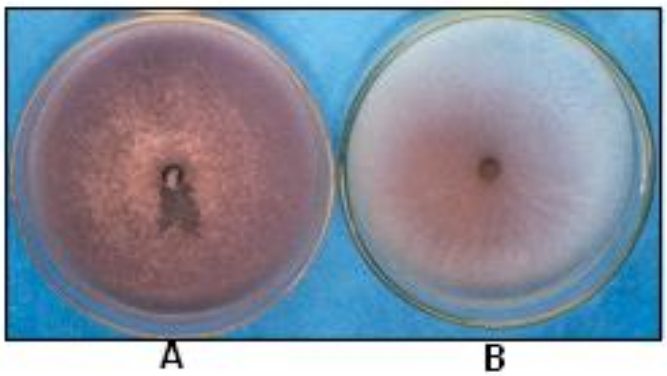

Figura 5. Ensaio antifungal. **(A)** Controle. *Fusarium moniliforme* sem inibidor; **(B)** *Fusarium moniliforme* + PvTI (500 μg/ml).

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

Conclusão

Neste estudo foi purificado um inibidor de tripsina de sementes de *Phaseolus vulgaris* cultivar IAC carioca (PvTI), ativo contra enzima do tipo tripsina, e que apresentou uma banda polipeptídica única de massa molecular aparente de 14 kDa, em SDS-PAGE. A sequência amino terminal do PvTI apresentou alta homologia com inibidores do tipo Bowman-Birk isolados de outras espécies de leguminosas. O inibidor apresentou atividade fungistática sobre *Fusarium moniliforme* e esse resultado, embora preliminar, pode ser promissor na busca por um bioproduto que possa ser utilizado contra fungos fitopatogênicos que atacam plantas economicamente importantes.

Agradecimentos

Ao Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas – SP e ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, (ESALQ/USP), Piracicaba, SP Brasil, pelo fornecimento das sementes de *Phaseolus vulgaris* cultivar IAC-Carioca e do fungo *Fusarium moniliforme*, respectivamente, e à CAPES, pelo suporte financeiro.

Referências

[1] Richardson, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Rogers, L. J, ed. Methods in plant biochemistry, amino acids, proteins and nucleic acids, Academic Press, New York, 5 (1991) 259-305.

[2] Macedo, M.L.R.; Pando, S.C.; Chevreuil, L.R.; Marangoni, S. Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae), Protein Peptide Lett., 16 (2009)1459-1465.

[3] Birk, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seeds-overview, Arch. Latinoam. Nutr., 44 (1994) 26-30.

[4] Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S. M.; Babu, C. R. A kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization and kinetic properties, Phytochemistry, 67 (2006) 232- 241.

[5] Chan, Y.S.; Zhang, Y.; Ng, T.B. Brown Kidney Bean Bowman-Birk trypsin Inhibitor is Heat and pH Stable and Exhibits Anti-proliferative Activity, Appl. Biochem. Biotechnol., 169 (2013) 1306-1314.

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

[6] Oliva, M.L.V.; Silva, M.C.C.; Sallai, R.C.; Brito, M.V. & Sampaio, M.U. 2010. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds, Biochimie, 92 (2010) 1667-1673.

[7] Kumar, V.; Gowda, L.R. Production of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor by na intein mediated protein purification system, Protein Expres. Purif., 89 (2013) 16-24.

[8] Tan, C. G. L.; Stevens, F. C. Amino acid sequence of lima bean proteinase inhibitor componente IV.2. Isolations and sequence determination of the chymotryptic peptideos and the complete amino acid sequence, Eur. J. Biochem., 18 (1971) 515-523.

[9] Odani, S.; Ikenaka, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. IV. Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor, J. Biochem., 71 (1972) 839-848.

[10] Singh, R.R.; Appu, R.A.G. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for “hyperreactive” disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding, Biochim. Biophys. Acta, 1597 (2002) 280-291.

[11] Bhattacharyya, A.; Babu, C.R. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into structural and antimalarial features, Phytochemistry, 70 (2009) 703-712.

[12] Dokka, M.K.; Davuluri, S.P. Antimicrobial activity of a trypsin inhibitor from the seeds of *Abelmoschus moschatus* L., Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 3 (2014) 184-199.

[13] Aguilar, J.A.E. Determinação de hospedeiros de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* do abacaxizeiro, Pesc. Agropec. Bras., 17 (1982) 709-714.

[14] Sartori, A.F.; Reis, E.M.; Casa, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho, Fitopatol. Bras., 29 (2004) 456-458.

[15] Mosolov, V.V.; Valueva, T. A. Proteinase Inhibitors and their function in plants:A Review, Appl. Biochem. Microbiol., 41 (2005) 227-246.

[16] Cruz, G.A.D.R.; Oliveira, M.G.D.A.; Pires, C.V.; Pilon, A.M.; Cruz, R.S.; Brumano, M.H.N.; Moreira, M.A. Avaliação da Digestibilidade Proteica, Inibidor de Protease e Fibras Alimentares de Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris L.*), Braz. J. Food Technol.,7 (2004)103-109.

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

[17] Jourdan, G.A.; Noreña, C.P.Z.; Brandelli, A. Inactivation of Trypsin Inhibitor Activity from Brazilian Varieties of Beans (*Phaseolus vulgaris L.*), Food Sci. Technol. Int., 13 (2007) 195-198.

[18] Chase, T.; Shaw, E. Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl, Meth. Enzymol., 19 (1970) 20-27.

[19] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding, Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.

[20] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.

[21] Edman, P.; Begg, G. A. protein sequenetor, Eur. J. Biochem., 1 (1967) 80-91.

[22] Morrison, J.F. The slow-binding and slow tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions, Trends Biochem. Sci., 7 (1982) 102-105.

[23] Paiva, P.M.G.; Oliva, M.L.V.; Fritz, H.; Coelho, L.C.B.B.; Sampaio, C.A.M. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds, Phytochemistry, 67 (2006) 545-552.

[24] Asao, T.; Imai, F.; Tsuji, I., Tashiro, M.; Iwami, K.; Ibuki, F. The amino acid sequence of a Bowman-Birk type proteinase inhibitor from faba beans (*Vicia faba* L.), J. Biochem., 110 (1991) 951-955.

[25] Shimokawa, Y.; Kuromizu, K.; Araki, T.; Ohata, J.; Abe, O. The complete amino acid sequence of *Vicia angustifolia* proteinase inhibitor, Nat. Cult., 10 (1984) 69-73.

[26] Baek, J.M.; Kim, S.I. Nucleotide sequence of a cDNA encoding soybean Bowman - Birk proteinase inhibitor, Plant Physiol., 102 (1993) 687-687.

[27] Zhang, Y.; Luo, S.; Tan, F.; Qi, Z.; Xu, L.; Zhang, A. Complete amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor, Chem. Biol. Agric. Med., 25 (1982) 268-277.

[28] Domoney, C.; Welham,T.; Sidebottom, C. Purification and characterization of *Pisum* seeds trypsin inhibitors, J. Exp. Bot. 261 (1993) 701-709.

[29] Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds, Agric. Biol. Chem., 52 (1988) 1245-1252.

ISSN 2178-0471
vol. 8 n.1 Jan. 2017
pág. 1-12

[30] Fang, E.F.; Hassanien, A.A.; Wong, J.H.; Bah, C.S.; Soliman, S.S.; Ng, T.B. Purification and modes of antifungal action by *Vicia faba* cv. Egypt trypsin inhibitor, J. Agric. Food Chem., 19 (2010) 10729-10735.

[31] Scarafoni, A.; Consonni, A.; Galbusera, V.; Negri, A.; Tedeschi, G.; Rasmussen, P.; Magni, C.; Duranti, M. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds, Phytochemistry, 69 (2008) 1820-1825.

[32] Lopes, J.L.S.; Valadares, N.F.; Moraes, D.I.; Rosa, J.C.; Araújo, H.S.S.; Beltramini, L.M. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*, Phytochemistry, 70 (2009) 871-879.

[33] Ye, X.Y.; Ng, T.B.; Rao, P.F. A Bowman-Birk Type Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor from Broad Beans, Biochem. Biophys. Res. Commun., 289 (2001) 91-96.