

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 24

Campinas, fevereiro de 1965

N.º 10

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DO LÁTEX DE DIVERSAS VARIEDADES DE *FICUS CARICA* L. (1)

VALDEMIRO C. SCARBIERI, *engenheiro-agrônomo, Seção de Química, Instituto Agrônomo*

RESUMO

O presente trabalho consistiu na separação das enzimas proteolíticas do látex de dez variedades diferentes de *Ficus carica* L. Todas as variedades estudadas são cultivadas na Califórnia (E.U.A.). O método empregado foi o de carboximetil celulose (CM-celulose).

O objetivo principal do trabalho foi verificar se havia diferenças entre os látexes das diversas variedades de figo, no que diz respeito a número, quantidade e propriedades de suas enzimas proteolíticas.

Diferenças quantitativas e qualitativas foram encontradas. As variedades *Kadota* e *Calimyrna* apresentaram-se, respectivamente, com 10 e 4 componentes proteolíticos ativos. A porcentagem da atividade recuperada foi calculada para cada variedade, bem como a contribuição percentual de cada componente de uma mesma variedade, com relação à proteína total recuperada da coluna. A atividade específica foi calculada, e apresentou variação para o mesmo componente, nas diversas variedades.

1 — INTRODUÇÃO

A ficina extraída do látex de diversas espécies do gênero *Ficus* (10) é um princípio ativo que age sobre proteínas. Embora sua atividade proteolítica tenha sido utilizada por séculos e Walti (13) tenha cristalizado uma enzima proteolítica do látex de figo, pouco se conhece sobre suas propriedades químicas, físicas e enzimáticas. A literatura indica que essa enzima do figo se assemelha muito à papaína com respeito à especificidade do substrato, atividade de esterase, reações de transpeptização e ativação por agentes redutores (11). Bernhard e Gutfreund (1), Hammond e Gutfreund (2) e Liener (6) purificaram parcialmente a ficina e estudaram suas propriedades.

(1) Parte dos trabalhos realizados na Universidade da Califórnia, Davis, E.U.A., para obtenção do título "Master of Science" (M.S.), em 1963. Recebido para publicação em 12 de janeiro de 1965.

Vários pesquisadores têm-se referido à presença de mais de um componente proteolítico na ficina. Nakao (8) demonstrou que as atividades da ficina sobre gelatina, peptona e benzoilglicil-glicina foram destruídas quando submetidas a diferentes tratamentos térmicos. Pelas técnicas de adsorção e precipitação com etanol, Krishnamurti e Subrahmanyam (3) conseguiram a separação parcial dos componentes do látex de *F. carica* que hidrolisam a caseína e coagulam o leite, respectivamente. Através de dados de variação da atividade da ficina sobre caseína com a variação do pH, Whitaker (14) postulou a presença de, pelo menos, duas enzimas proteolíticas do látex de *Ficus glabrata*. Messing e Van Ness (7) obtiveram três componentes proteolíticos ativos do látex de *F. glabrata*, usando a técnica de eletroforese de cortina. Smith e Kimmel (11) demonstraram que preparações cristalinas de ficina mostram-se heterogêneas quando submetidas à eletroforese.

Trabalhos realizados por Whitaker, Kramer, Gupte e Sgarbieri (12), nos laboratórios de enzimologia da universidade da Califórnia, em Davis, permitiram-lhes concluir que o uso da cromatografia de coluna em carboximetil celulose dá os melhores resultados no isolamento e purificação das enzimas proteolíticas do látex do figo.

O interesse pelo estudo das enzimas do figo se deve ao fato de esse material se ter revelado de grande valor em determinados setores da indústria e nos laboratórios, como agente hidrolisante das proteínas.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 — MATERIAIS

As dez variedades de *Ficus carica* L. utilizadas neste trabalho são classificadas em quatro grupos:

a) Tipo caprífigo. É o tipo mais primitivo de figo cultivado e se caracteriza por apresentar flôres de pistilos curtos, adaptadas à oviposição da vespa (*Blastophaga psenes* Cav.).

Pertence a este grupo a variedade Stanford, com interior violeta ou púrpura e casca verde.

b) Tipo Smirna. Só se desenvolve após fertilização de suas flôres de pistilos longos e conseqüente desenvolvimento de sementes férteis.

Pertence a este grupo a variedade Calimyrna, com interior de cor branca, âmbar ou ligeiramente avermelhada, e casca verde ou amarela.

c) Tipo São Pedro. Os frutos podem se desenvolver tanto partenocarpicamente como através do processo de fertilização.

Pertence a este grupo a variedade King, que apresenta polpa vermelha e casca verde.

d) Tipo comum. Os frutos se desenvolvem por partenocarpia, isto é, não necessitam de fertilização.

Pertencem a este grupo as seguintes variedades: Kodata e Blanquette, com polpa clara e casca verde; Adriatic, pele verde ou amarela e polpa com várias tonalidades de vermelho; Beall, pele escura e polpa branca ou âmbar; Brown Turkey e Black Mission, com pele escura e polpa com várias tonalidades de vermelho.

Finalmente, a variedade Conadria, que resultou do cruzamento entre Adriatic e uma variedade californiana do tipo Caprífigo.

Os látices estudados dessas dez variedades de figo provieram de três regiões diferentes da Califórnia. Os das variedades Califórnia Brown Turkey, Calimyrna, Beall, King, Blanquette, Black Mission e Stanford foram obtidos nos pomares da Universidade da Califórnia, em Davis. O látex da variedade Kodata foi obtido do pomar do Senhor Ed Scott, em Planada, Califórnia, e, finalmente, os das variedades Adriatic e Conadria, da coleção de variedades que a Estação Experimental de Riverside, em cooperação com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, mantém em Fresno.

Carboximetil celulose — A carboximetil celulose (CM-celulose) usada neste estudo foi preparada a partir de pó de celulose Whatman (Baum — Knecht — Heimann Co., São Francisco), pela técnica de Peterson e Sober (9). Antes da carboximetilação, o material foi peneirado, a fim de se obterem partículas de 80-100 «meshes». O material final apresentava 0,49 meq. de grupos carboxílicos por grama de peso seco.

Substrato e ativadores — A caseína usada como substrato foi Hammerstein Quality, obtida da Nutritional Biochemicals Corporation, Cheveland 28, Ohio. O verseno (grau analítico), obtido da Eastman Kodak Co., Rochester 3, New York, e a cisteína — HCl, obtida da Mann Research Laboratories, Inc., New York, foram usados como substâncias ativadoras na mistura reativa.

2.2 — MÉTODOS

a) **Preparação dos látices** — Para coletar o látex, quebram-se os pedúnculos dos frutos verdes, e o líquido leitoso é coletado em vasilhame de vidro. Esse material é levado ao laboratório dentro de uma hora, e submetido a uma centrifugação de 30.000 rpm (59.000 x g) a 0°C, durante 20 minutos, em uma ultracentrífuga Spinco. A goma ou látex de cor branca separa-se na parte superior. O líquido claro amarelado é cuidadosamente removido dos tubos, congelado e armazenado a 20°C.

b) **Preparação da resina e da coluna** — Antes de ser usada, a CM-celulose foi lavada com cisteína — HCl 0.1 M, para remover todo e qualquer excesso de ácido monocloroacético. Todas as vezes, depois de usada, a resina foi lavada consecutivamente com hidróxido de sódio 0.5 M, que continha 0.5 M de cloreto de sódio, com água deionizada até eliminar completamente os íons Cl, com solução tampão 0.1 M de fosfato de sódio pH 7,00 e, finalmente, cinco vezes com solução tampão de fosfato de sódio 0.01 M pH 7,00 que continha 0,12 N de cloreto de sódio. A coluna (2,0 x 45,0 cm) foi preenchida à temperatura ambiente, em seguida transportada para câmara frigorífica (4°C) e lavada com 500 ml da solução tampão de fosfato 0,01 M pH 7,00 com 0,12 M de cloreto de sódio.

c) **Adsorção da enzima à CM-celulose** — A CM-celulose era equilibrada com uma solução tampão que continha 0,01 M de ácido cítrico e fosfato de sódio 0,02 M pH 4,90, praticamente como descrito para a preparação da coluna, substituindo-se apenas a solução tampão. A três gramas dessa resina assim preparada e parcialmente seca por filtração a vácuo, adicionaram-se 2,0 ml do látex e 10,0 ml da solução tampão mista, ácido cítrico 0,01 M mais NaH_2PO_4 0,02 M pH 4,90. Após 5 minutos, filtrava-se através de um pequeno funil de Buchner. A resina era lavada mais seis vezes com 10,0 ml da solução tampão. Nos filtrados provenientes dessas lavagens eram determinadas as proteínas e a atividade enzimática não adsorvida. Esse tratamento elimina cerca de 60-70% do material que absorve no comprimento de onda de 280 $\text{m}\mu$ e somente 2-5% proteolíticas.

A resina com as enzimas adsorvidas era imediatamente posta no tópo da coluna e iniciava-se a cromatografia. Frações de 10,0 ml eram coletadas à velocidade de eluição de 1,5 ml/minuto. Todos os cromatogramas foram executados pelo menos em duplicata.

d) Concentração de proteína — A proteína nas amostras eluídas da coluna, bem como nas frações coletadas durante as lavagens dos materiais não adsorvidos, para todos os cromatogramas, foi determinada pela leitura da absorção a 280 $m\mu$ em um espectrofotômetro Beckman Du.

e) Concentração de proteína — A proteína nas amostras eluídas terminada pela digestão da caseína a 2% que foi preparada com solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, dH 7.60, aquecendo-se em banho de água fervente cêrca de 15 minutos. O pH final dessa solução com 2% de caseína era 7.2, sendo estável por uma semana quando armazenada em refrigerador. Em cada tubo de ensaio colocavam-se 1.0 ml de solução de caseína 2%, 0,3 ml de solução tampão de fosfato de sódio 1.00 M pH 7.00, 0,5 ml de hidróxido de sódio 0,05 N, 0,1 ml de cisteína — HCl 0,25 M e 0,1 ml de verseno 0,25 M. A quantidade de tampão adicionada era suficiente para baixar o pH da mistura até 7,00. A mistura era assim preparada imediatamente antes de ser usada a fim de evitar a oxidação da cisteína e, em seguida, equilibrada a 35°C num banho de temperatura controlada. Após equilíbrio (10-15 minutos), 0,05 ml da solução de enzima era adicionada a cada um dos tubos de ensaio que continha a mistura reativa, em intervalos de 30 segundos. As reações eram interceptadas após o tempo de incubação desejado, adicionando-se 3,0 ml de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. O precipitado era agitado enèrgicamente com um bastonete de vidro e, em seguida, os tubos permaneciam pelo menos uma hora à temperatura ambiente antes de centrifugá-los. A centrifugação era feita numa centrífuga Internacional, modelo clínico, durante 10-15 minutos, a 2.000 rpm. O líquido claro sobrenadante, solúvel em (TCA), era removido e a densidade ótica da solução determinada a 280 $m\mu$, em um espectrofotômetro Beckman Du. A atividade específica foi expressa em termos de variação da densidade ótica a 280 $m\mu$ por minuto por ml da mistura reativa, dividida pela densidade ótica a 280 $m\mu$ por ml da amostra original.

3 — RESULTADOS EXPERIMENTAIS

A técnica usada no preparo da enzima para a coluna, isto é, adsorção em CM-celulose ao pH 4,90, eliminava, em média, 67% do material que absorve a $280 m\mu$; contudo, somente 4,70, em média, da atividade proteolítica não era adsorvida à CM-celulose a esse pH.

A análise dos cromatogramas mostra que os componentes 1 e 2 eram eluídos em tampão de fosfato 0,01 M pH 7,00, o qual continha uma concentração 0,12 N de cloreto de sódio; os componentes 3, 4, 5 e 6 eram eluídos no mesmo tampão com apenas uma concentração maior de cloreto de sódio, 0,17 N; os componentes 7, 8 e 9 eram eluídos na mesma solução tampão de fosfato de sódio, que continha, porém, 0,23 N de cloreto de sódio e, finalmente, o componente número 10 só era eluído quando se usava o mesmo tampão, porém com 0,50 N de cloreto de sódio (figuras 1 a 3).

Essas condições foram estabelecidas como sendo as melhores para o látex da variedade Kadota e todos os outros foram estudados sob as mesmas condições, para se estabelecer uma comparação entre variedades.

Os dados mostram grandes variações qualitativas e quantitativas entre as dez variedades estudadas. A mais complexa que se apresentou foi a variedade Kadota, com dez componentes proteolíticos diferentes, e as menos complexas foram as variedades Calimyrna e Blanquette, com quatro componentes. As outras apresentaram número intermediário de componentes (quadro 1).

O quadro 1 também mostra como os diferentes componentes para as dez variedades estudadas foram eluídos da coluna.

Observa-se que os componentes 7 e 8 da variedade Kadota foram eluídos consideravelmente depois que os mesmos componentes para as outras variedades. Ao contrário, na variedade King os componentes 8 e 9 foram eluídos antes.

Quantitativamente, pode-se também encontrar acentuadas diferenças entre os componentes de látices diferentes. As porcentagens de atividade e proteína totais recuperadas da coluna para cada variedade, bem como a atividade específica de cada componente, podem ser analisadas no quadro 2.

Torna-se evidente, pelo exame dos cromatogramas (figuras 1 a 3 e quadro 2), que a maior porcentagem da atividade total foi eluída em

QUADRO 1. — Número de amostras de 10 ml necessários para a eluição dos diferentes componentes proteolíticos das variedades de *F. carica* estudadas. As mudanças do eluente para diferentes concentrações foram feitas com o mesmo número de frações coletadas em fôdas as variedades. Tamanho da coluna 2,0 x 45,0 cm

Variedades	Componentes proteolíticos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kadota	38	49	79	86	99	114	(*) 138	(*) 199	207	260
Black Mission	40	54	tr	0	104	tr	144	177	0	258
Adriatic	0	50	71	80	101	109	142	172	0	256
Calif. Brown Turkey	36	48	78	82	0	108	142	(*) 169	0	257
King	0	0	77	83	0	108	143	152	(*) 189	261
Stanford	35	46	71	75	0	110	146	170	0	258
Calymirna	38	0	tr	0	0	106	143	168	0	0
Blanquette	0	tr	82	86	0	0	145	0	0	259
Beall	40	53	tr	0	0	106	141	169	0	258
Conadria	38	50	tr	0	96	0	142	167	0	257

(*) Esses componentes exigiram volumes de eluente um pouco diferentes da média para serem extraídas das colunas.

QUADRO 2. — Composição aproximada em enzimas proteolíticas do látex de diversas variedades de *F. carica*

Determinações	Componentes										Porcentagem de atividade total recuperada
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ADRIATIC											
Proteína — %	17,30	6,66	5,07	8,34	7,38	13,60	21,80	12,90	0,00	7,00	
Atividade — %	0,00	3,75	3,40	7,04	7,60	13,80	37,40	12,70	0,00	14,30	
Atividade específica	0,00	4,80	3,00	3,20	2,77	3,67	6,36	3,25	0,00	8,65	62,60
BEALL											
Proteína — %	1,79	8,72	0,00	0,00	0,00	41,50	26,50	18,60	0,00	3,70	
Atividade — %	1,50	11,50	0,00	0,00	0,00	40,10	31,20	12,40	0,00	3,20	
Atividade específica	3,31	9,22	0,00	0,00	0,00	5,45	6,59	3,88	0,00	6,52	99,00
BLACK MISSION											
Proteína — %	2,42	21,80	0,00	0,00	14,00	0,00	25,40	26,60	0,00	8,35	
Atividade — %	1,38	31,10	0,00	0,00	9,07	0,00	30,40	13,00	0,00	14,90	
Atividade específica	3,96	10,10	0,00	0,00	2,46	0,00	6,48	2,73	0,00	9,96	84,80
BLANQUETTE											
Proteína — %	0,00	2,25	13,60	10,10	0,00	0,00	64,40	0,00	0,00	8,75	
Atividade — %	0,00	1,10	13,50	9,40	0,00	0,00	58,40	0,00	0,00	18,80	
Atividade específica	0,00	2,40	7,09	7,89	0,00	0,00	4,96	0,00	0,00	14,50	97,40
CALIFORNIA BROWN TURKEY											
Proteína — %	4,35	5,25	10,10	7,95	0,00	12,40	33,30	22,60	0,00	5,85	
Atividade — %	2,54	3,86	9,55	8,37	0,00	11,00	38,20	15,70	0,00	10,80	
Atividade específica	2,81	5,51	5,74	5,98	0,00	4,71	6,25	3,72	0,00	9,85	82,50

QUADRO 2. — (continuação).

Determinações	Componentes										Porcentagem de atividade total recuperada
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
KADOTA											
Proteína — %	8,40	5,25	10,20	10,60	6,64	10,80	16,80	12,90	6,72	10,80	10,80
Atividade — %	4,82	2,61	7,56	11,40	5,94	10,00	20,80	6,24	4,75	27,90	85,40
Atividade específica	2,54	4,19	4,04	5,47	3,24	5,40	5,70	2,70	3,30	14,60	---
CONADRIA											
Proteína — %	2,62	15,20	0,00	0,00	22,70	0,00	35,00	18,40	0,00	6,20	---
Atividade — %	1,47	22,10	0,00	0,00	18,50	0,00	37,70	11,00	0,00	9,05	98,40
Atividade específica	3,33	13,90	0,00	0,00	4,72	0,00	7,37	4,26	0,00	11,00	---
CALLEMYRNA											
Proteína — %	6,75	0,00	0,00	0,00	0,00	56,20	21,20	14,40	0,00	0,00	---
Atividade — %	4,30	0,00	0,00	0,00	0,00	55,00	30,70	9,96	0,00	0,00	90,80
Atividade específica	2,97	0,00	0,00	0,00	0,00	4,46	6,89	3,96	0,00	0,00	---
KING											
Proteína — %	0,00	0,00	11,60	11,50	0,00	2,77	24,20	22,40	14,50	9,44	---
Atividade — %	0,00	0,00	12,90	10,40	0,00	3,51	20,80	24,60	11,10	16,50	94,80
Atividade específica	0,00	0,00	7,21	6,00	0,00	4,53	6,95	6,62	5,01	13,90	---
STANFORD											
Proteína — %	3,75	2,80	4,80	2,61	0,00	18,50	54,50	7,67	0,00	3,45	---
Atividade — %	2,52	3,33	4,64	2,13	0,00	16,40	59,50	6,77	0,00	3,77	93,80
Atividade específica	4,12	6,20	5,94	4,83	0,00	4,32	5,80	3,96	0,00	8,46	---

solução tampão de fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,00, e 0,23 N de cloreto de sódio. O componente 10 também representou sempre boa porcentagem (9-29,6%) da atividade total para tôdas as variedades, exceto Stanford (4,77%), Beall (3,20%) e Calimyrna (0%).

O componente 2 representa boa porcentagem da atividade total nas variedades Conadria, Beall e Black Mission (15,20, 8,72%, 21,80%, respectivamente).

O componente 6 representa 40,10% da atividade total recuperada na variedade Beall. A variedade Adriatic foi a única que apresentou um dos componentes eluídos da coluna completamente inativo. Deve-se notar que êsse componente foi eluído da coluna antes do ponto em que o componente 1 usualmente aparece (figura 3). Para tôdas as outras variedades, os componentes eluídos foram enzimaticamente ativos.

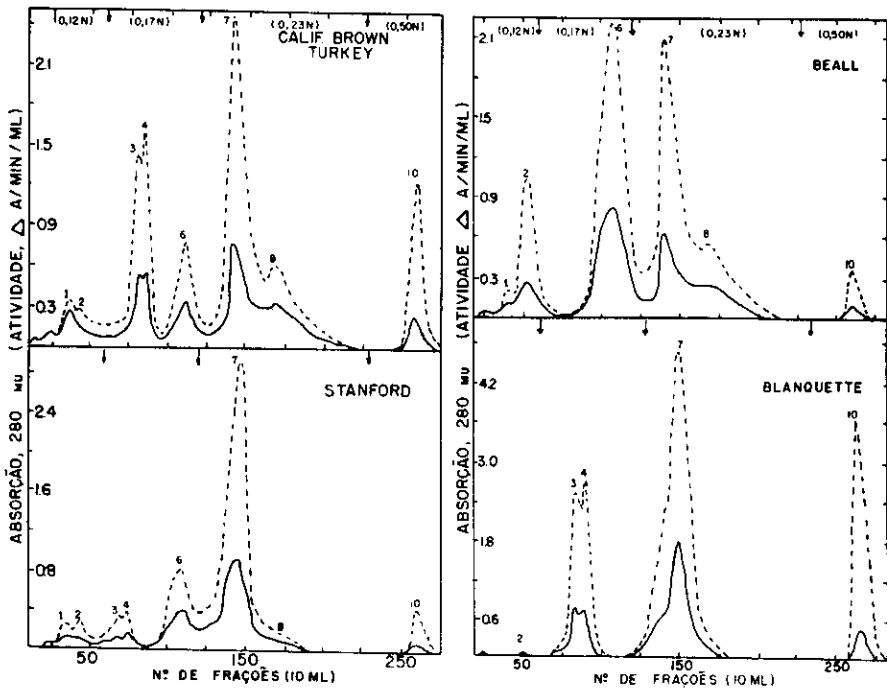


FIGURA 1. — Cromatografia dos látices de *F. carica*, variedades King, Calimyrna, Black Mission e Conadria, em colunas de CM — celulose (2,0 x 45,0 cm) a 4°C, usando-se como eluente soluções tampões de fosfato de sódio pH 7,00, contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,12 N, 0,17 N, 0,23 N respectivamente). Absorção a 280 mμ (—). Atividade sobre caseína a 1%, pH 7,00 e 35°C. (---).

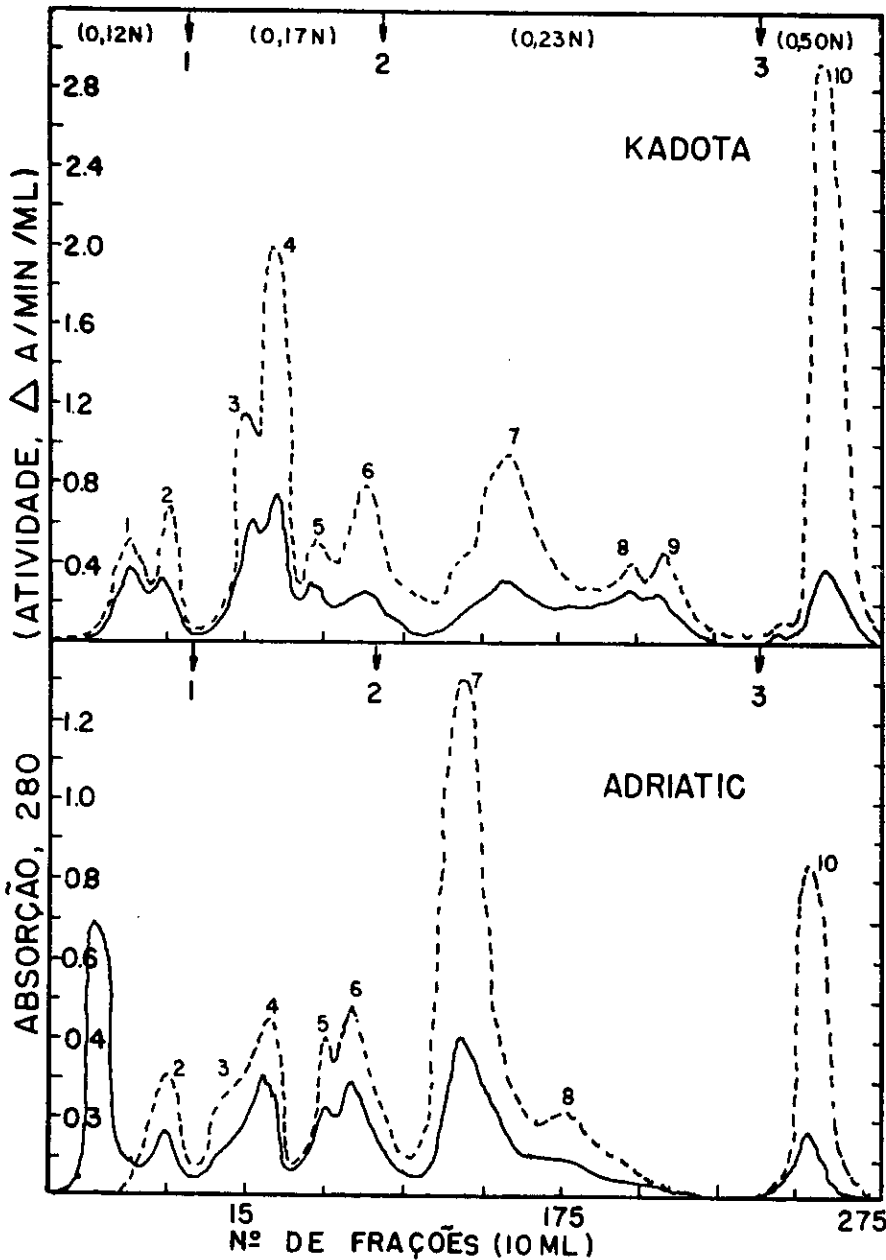


FIGURA 2. — Cromatografia dos latices de *F. carica*, variedades California Brown Turkey, Stanford, Beall e Blanquette, em colunas de CM — celulose (2,0 x 45,0 cm) a 4°C, usando-se como eluente soluções tampões de fosfato de sódio pH 7,00 contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,12 N, 0,17 N, 0,23 N e 0,50 N, respectivamente). Absorção a 280 mμ (—). Atividades sobre caseína a 1%, pH 7,00 e 35°C. (---).

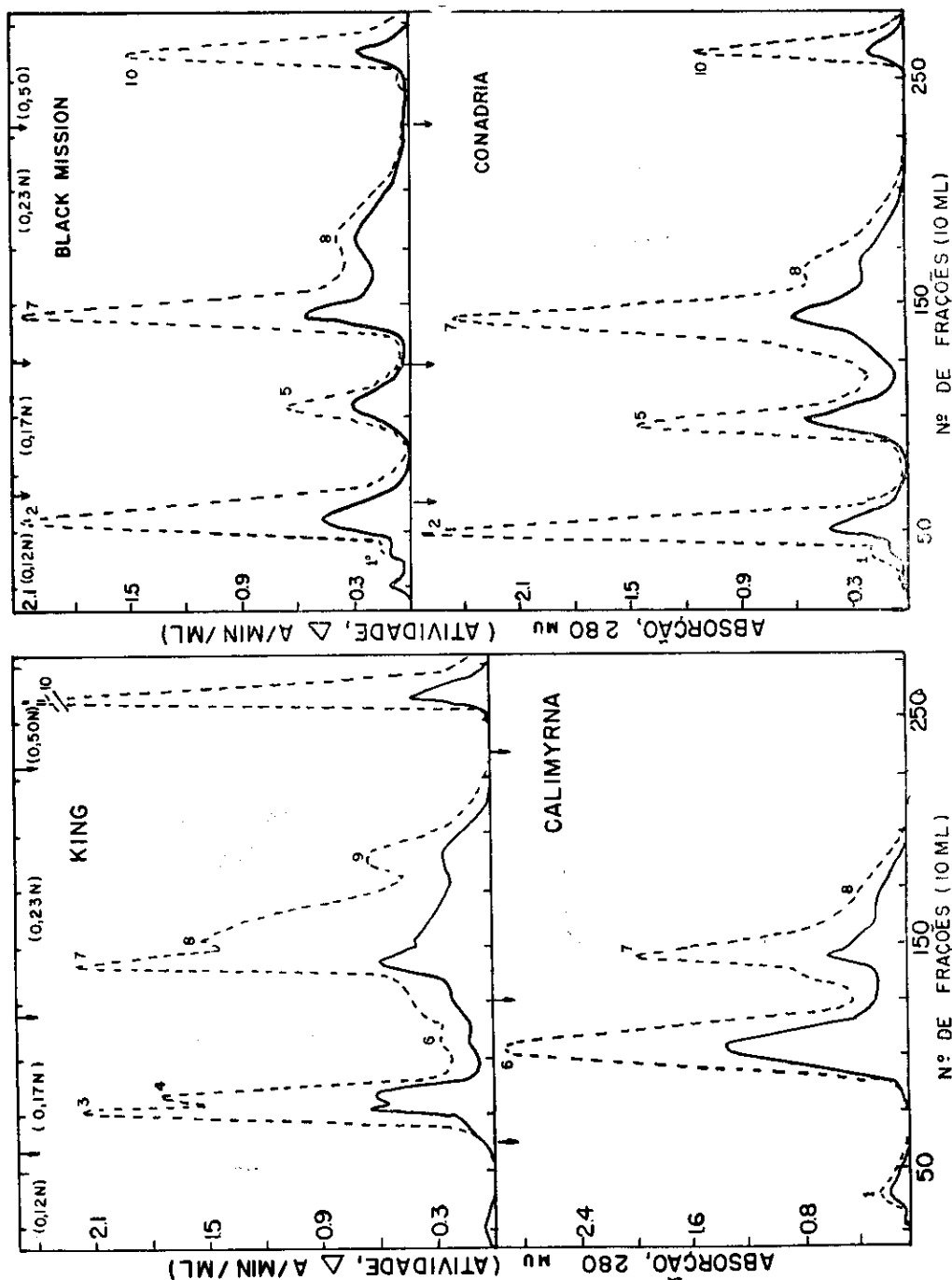


FIGURA 3. — Cromatografia dos látices de *F. carica*, variedades Kadota e Adriatic, em colunas de CM — celulose (2,0 x 45,0 cm) a 4°C, usando-se como elvente soluções tampões de fosfato de sódio pH 7,00, contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,12 N, 0,17 N, 0,23 N e 0,50 N, respectivamente). Absorção a 280 mμ (—). Atividade sobre caseína 1%, pH 7,00 e 35°C.

4 — DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

É muito provável que os componentes obtidos por cromatografia para os diferentes látices não sejam homogêneos e possam sofrer purificações posteriores.

Por recromatografia de cada um dos dez componentes de *Ficus carica* variedade Kodota, Kramer (5) demonstrou que a separação em colunas de CM-celulose, nas condições usadas nesse trabalho, não fornece componentes homogêneos, passando-se o látex uma única vez através da coluna; contudo, homogeneidade pode ser obtida por sucessivas recromatografias.

É também admissível que melhor separação se pudesse conseguir para as nove variedades, excetuando-se a Kadota, desde que as condições foram inicialmente ajustadas para ela e que os resultados mostram diferenças quantitativas e qualitativas entre variedades.

O máximo número de componentes isolado foi dez na variedade Kadota. Das dez variedades estudadas, Calimyrna e Blanquette apresentaram somente quatro componentes. Todas as outras apresentaram um número intermediário de componentes proteolíticos.

Apesar dessas diferenças quanto ao número de componentes, cada componente isolado de cada variedade mostrou acentuada semelhança cromatográfica com o mesmo componente de outras variedades. Isso leva a postular que, muito provavelmente, em outras variedades de *F. carica*, ainda não estudadas, não será encontrada nova enzima proteolítica com diferente comportamento no que diz respeito à cromatografia.

A discrepância encontrada para a atividade específica de certos componentes para diferentes variedades pode ser explicada com base em três fatos: concentração relativa dos componentes, presença, no mesmo pico, de mais de um componente com diferentes atividades específicas, e diferenças no espaço de tempo, desde que as frações foram coletadas até a determinação da atividade enzimática.

A influência da concentração relativa na atividade específica pode ser verificada para o componente 10 (quadro 2). As variedades Stanford e Beall, que tinham quantidades menores do componente 10, apresentaram uma atividade específica muito mais baixa do que as outras para o mesmo componente. Em concentração muito baixas, as enzimas perdem atividade.

No caso dos componentes 7 e 8, que aparecem em quantidades apreciáveis para tôdas as variedades, a atividade específica está em boa concordância, exceto para a King, em que o componente 8 foi aluído antes do ponto de eluição para as outras variedades.

Para os outros componentes, desde que representam em geral pequena fração da atividade total, as diferenças em atividade específica devem ser atribuídas, principalmente, à superposição de outros componentes, bem como às diferenças no tempo decorrido antes que a atividade fôsse determinada.

Desde que as variedades estudadas pertencem à mesma espécie, e os caracteres da genética clássica, tais como número e forma dos cromossomos, morfologia celular e partenocarpia, não explicam as diferenças encontradas na composição enzimática dos diferentes látices, deve-se procurar a explicação para o fenômeno ao nível da estrutura molecular, ou seja, na dinâmica química das macromoléculas que constituem os genes.

Um estudo da moderna literatura sôbre bioquímica e genética fisiológica leva a concluir que os organismos vivos são, em grande parte, um reflexo das enzimas que contêm e que as enzimas são, por sua vez, uma manifestação da atividade dos ácidos nucleicos das células. Todos os bioquímicos têm-se familiarizado com a teoria que relaciona a seqüência linear dos amino-ácidos em uma proteína, a determinada seqüência de nucleotídeos no DNA (ácido desoxiribonucleico) e no RNA (ácido ribonucleico).

Esta inter-relação tem sido referida na literatura como a hipótese «um gene-uma enzima». Market e Apella (15), citadas por Wroblewski, com base nesta hipótese, lançaram a teoria de que um organismo homozigoto sintetizaria moléculas idênticas para cada uma de suas proteínas, e isto seria verdadeiro para tôdas as células do organismo. Quanto mais homozigoto um organismo, tanto mais homogêneo seriam suas proteínas do ponto de vista molecular, e as formas multimoleculares de uma mesma enzima produzida por organismos homozigotos seriam iso-enzimas.

É possível que as enzimas proteolíticas encontradas nessas variedades representam os produtos finais de uma seqüência de modificações ocorridas na planta durante sua ontogenia.

Dentro desses princípios, poder-se-ia imaginar que a biossíntese de cada um desses componentes fôsse controlada por um gene diferente.

Desde que uma proteína é sintetizada e pode ser modificada, quanto à sua estrutura e função, sob a influência do genótipo e fatores microecológicos, é razoável admitir que algumas variedades possuem genes mais adaptados e operantes para suas funções do que outras.

As grandes diferenças quantitativas encontradas para alguns componentes em certas variedades, somente podem ser interpretadas em termos de diferenças genotípicas, em estreita interação com os fatores microecológicos.

PROTEOLYTIC ENZIMES FROM SEVERAL VARIETIES OF *FICUS CARICA* L.

SUMMARY

Latex from 10 varieties of *Ficus carica* were fractionated by column-chromatography on CM-cellulose under the same conditions.

Both qualitative and quantitative differences were found among different varieties. The percentage of activity recovered was calculated for all varieties as well as the percentage of protein and activity that the different components contributed to the total protein and activity recovered from the column.

The percentage of the total activity recovered from the column ranged from 62.6% in Adriatic to 99% for the Beall variety.

The most complex latex in terms of proteolytic activity was from Kadota which had 10 active components. In this variety component 2 accounted for 2.80% of the total activity while component 10 accounted for 29.6%. The specific activity of the components in this variety ranged from 1.28% for component 1 to 7.52 for component 10.

The least complex latices were obtained from Calimyrna and Blanquette which had 4 components each. In the Calimyrna latex component 1 accounted for 4.30% of the total activity while component 6 accounted for 54.95%. Component 10 was absent in Calimyrna latex. The specific activity of the components from Calimyrna ranged from 1.5 for component 1 to 3.57 for component 7. The latter was the only component that appeared in all the varieties studied.

In most of the latices component 7 and 8 accounted for a large amount of the total activity. However component 6 composed 40.10% of the total activity in Beall and 54.95% of the total activity in Kodata.

Most of the components were chromatographically very similar for all the different varieties.

The specific activity was the highest for component 10 in all varieties studied except for Beall and Conadria. For these two varieties component 2 had the highest specific activity.

Adriatic was the only variety studied which had a large protein fraction

(17.32% of the total) which was adsorbed to the resin but which had no enzymatic activity.

Despite the quantitative and qualitative differences among varieties one should notice that no more than 10 components were found and that these appear to be the same for all the latices studied.

An attempt was made to explain these differences on the basis of both genetic and ecological factors.

LITERATURA CITADA

1. BERNHARD, S. A. & GUTFREUND, H. Ficin — Catalyzed Reactions: The Affinity of Ficin for Some Arginine derivatives. *Biochem. J.* **63**: 61. 1956.
2. HAMMOND, B. R. & GUTFREUND, H. The Mechanism of Ficin — Catalyzed Reactions. *Biochem. J.* **72**: 349. 1959.
3. KRISHNAMURTI, C. R. & SUBRAHMANYAN, V. Purification of the Milk — Cholting Enzyme of Fig Latex. *Indian J. Dairy Sci.* **6**: 15. 1953.
4. KUNITZ, M. J. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. II. General Properties. *Gen. Physiol.* **30**, 291. 1947.
5. KRAMER, D. E. The Separation and Purification of the Proteolytic Enzymes from the Latex of **Ficus carica**, Linn. Thesis for Master of Arts in Comparative Biochemistry — Graduate Division — University of California, Davis, California.
6. LINNER, I. E. A Study of the number and Reactivity of the Sulfhydryl Groups of Ficin. *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 232. 1961.
7. MESSING, R. E. & VAN NESS, W. P. Separation of Ficin Components by Curtain Electrophoresis. *Enzymol.* **23**, 373. 1961.
8. NAKAO, T. Ficin. IV. Studies on Ficin Components. *Acta Schol. Med. Univ. Kioto* **30**, 117; 1952, *Chem. Abstract.* 47.10568a. 1953.
9. PETERSON, E. A. & SOBER, H. A. Chromatography of Proteins. I. Cellulose Ion — exchange Adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751. 1956.
10. ROBINS, B. H. A Proteolytic Enzyme in **Ficus**, the Anthelmintic Principle of Leche de Higuero. *J. Biol. Chem.* **87**, 251. 1930.
11. SMITH, E. L. & KIMMEL, J. R. Ficin. *In* The Enzymes, vol. 4, Boyer, P. D., Lardy, H., e Myrbäck, K., editores, Academic Press, New York, p. 133. 1960.
12. SGARBIERI, V. C., GUPTE, S. M., KRAMER, D. E. & WHITAKER, J. R. I. Separation of the Proteolytic Enzymes of **Ficus carica** and **Ficus glabrata** Latices. *J. Biol. Chem.* **239**, 2170. 1964.
13. WALTI, A. J. Crystalline Ficin. *Am. Chem. Soc.* **60**, 493. 1938.
14. WHITAKER, J. R. Properties of the Proteolytic Enzymes of Commercial Ficin. *Food Research* **22**, 483. 1957.
15. WROBLEWSKI, F., (Conference Editor) and FURNESS, F. N. (Publication Editor). Multiple Molecular Forms of Enzymes. *Annals N. Y. Acad. of Sci.*, **94**. 1030. 1961.