รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยาง ในต้นยางพารา

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging of *Hevea brasiliensis*

หอสมุด คุณหญิงหลง ธรรเกาะวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับจาก
วันที่ ... เลขที่ ...

โดย

รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล
*ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล,
ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล
นพแก้ว เจริญทิพากร
*กมลชนก รักเสรี

Order Key 28026
BIB Key 175517

เลขหมู่ QK648.L3 T64 I 2543
เลขทะเบียน ...
1 - 8 W.A. 2543

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
* มหาวิทยาลัยมหิดล

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยางในต้นยางพารา

รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล, *ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, นพแก้ว เจริญทิพากร
และ *กมลชนก รักเสรี
ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
*ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

****

บทคัดย่อ

น้ำยางเป็นของเหลวสีขาวที่ถูกสร้างและบรรจุอยู่ภายในท่อน้ำยาง นอกจากส่วนของของเหลวใส (C-serum) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักแล้ว น้ำยางจะประกอบไปด้วยอนุภาคแขวนลอยต่างๆจากปริมาณมากไปหาน้อย คือ อนุภาคยาง, อนุภาคลูทอยด์ (lutoid) และ แฟรวิสลิ่งคอมเพลกซ์ การกรีดโดยเฉือนผ่านท่อน้ำยางจะทำให้น้ำยางไหลออกมา ต้นยางจะมีวิธีการยับยั้งการสูญเสียน้ำยางดังกล่าว โดยการก่อให้เกิดการอุดตันบริเวณปลายท่อที่ถูกเฉือน การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนพบว่า บริเวณอุดตันปลายท่อน้ำยางดังกล่าวจะมีก้อนอุดตันที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยางและซากอนุภาคลูทอยด์ที่แตกแล้วเกาะจับกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่อยับยั้งการไหลของน้ำยาง ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยางในต้นยางพารา น่าจะเกิดขึ้นได้จาก การประสานงานระหว่างการทำงานของกระบวนการหลัก 2 กระบวน คือ กระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการแตกของอนุภาคลูทอยด์ และ กระบวนการที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวโยงกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่ม ระหว่างซากของลูทอยด์ที่แตกแล้วกับอนุภาคยาง

การกรีดเพื่อเปิดท่อน้ำยางเพื่อให้น้ำยางไหลออกนั้น จะทำให้บริเวณปลายท่อดังกล่าวสัมผัสกับบรรยากาศภายนอก O_2ที่ได้รับจากอากาศจะส่งผลกระตุ้นต่อการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสหลายตัวที่ยังผลให้เกิดการสร้าง active oxygen species ซึ่งได้แก่ superoxide ($O_2^{\cdot-}$) , hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) และ H_2O_2 โดย active oxygen species เหล่านี้ จะร่วมกันทำลายเสถียรภาพของเมมเบรน ของลูทอยด์ โดยเริ่มจาก เอนไซม์ NAD(P)H ออกซิเดส หรือ NAD(P)H คิวโนน รีดัสเตส ที่เมมเบรนของลูทอยด์ จะรีดิวซ์สัปสเตรท คิวโนน ไปเป็น ไฮโดรคิวโนน และ เซมิ-ควิโนน ซึ่ง เซมิ-คิวโนน นี้สามารถใช้ O_2 ออกซิไดส์ตัวเองกลับไปเป็น คิวโนน โดยจะให้ $O_2^{\cdot-}$ และหากในขณะนั้นมี H_2O_2 อยู่ด้วย $O_2^{\cdot-}$ ก็จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เกิด $OH^{\cdot}$ ขึ้น (ปฏิกิริยา Fenton & Haber-Weiss) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโครงสร้างไขมันไม่อิ่มตัว ที่เมมเบรนของลูทอยด์ ส่งผลให้ลูทอยด์แตก ในขณะเดียวกันเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลี่ฟีนอลออกซิเดส ที่อยู่ในส่วนของของเหลว ซี-ซีรั่ม ในน้ำยางก็จะอาศัยการใช้ H_2O_2 และ O_2 ตามลำดับ ในการออกซิไดส์ สัปสเตรท ไฮโดรคิวโนน ให้กลับ

ไปเป็นคิวโนน ทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิด เซมิ-คิวโนน และ active oxygen species ได้มากขึ้นอีก แต่หากในขณะนั้นมี สัปสเตรทตัวอื่นๆ เช่น ฟีนอลที่อยู่ในซี-ซีรั่ม มาแข่งขันกับสัปสเตรทคิวโนน ก็อาจทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มคิวโนน จากเซมิ-คิวโนน ลดลง การทำงานของเปอร์ออกซิเดสและโพลี่ฟีนอลออกซิเดส ไม่ว่าจะใช้สัปสเตรทตัวใดก็ตาม จะมีผลในการลดปริมาณ H_2O_2 และ O_2 ลงตามลำดับ นอกจากนั้นคณะวิจัยยังพบว่าทั้งปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกนอกของไม้ยาง ที่ได้จากการกรีด และปริมาณสารฟีนอลใน ซี-ซีรั่มของน้ำยาง จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์ สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.76 และ 0.91 ตามลำดับ

เมื่อลูทอยด์แตกจะทำให้ลูทอยดิน (lutoidin) ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติเป็นเลคตินที่บริเวณผนังเมมเบรนของลูทอยด์โผล่ออกมา ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง การเกาะจับจำเพาะของลูทอยดินกับอนุภาคยางนี้ ไม่ได้เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ แต่เกิดจากการที่ receptor site ของลูทอยดิน สามารถ recognize กลุ่ม ไกลโคโปรตีนบนโปรตีน (rubber particle-lutiodin binding protein, RP-LBP) ที่ผิวของอนุภาคยาง ทำให้เกิดการเกาะจับจำเพาะและรวมกันเป็นกลุ่มก้อนซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตันในท่อน้ำยางได้ โดยเราจะสามารถเห็นลักษณะการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางดังกล่าวได้ จากการทดลองนำลูทอยดินที่แยกและทำบริสุทธิ์ได้จาก ผนังเมมเบรนของลูทอยด์มาผสมกับอนุภาคยาง ในสภาพธรรมชาติเมื่อลูทอยด์แตกแล้ว ซากเมมเบรนของลูทอยด์จะแขวนลอยอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในท่อน้ำยาง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าใน ส่วนที่เป็นของเหลวดังกล่าว จะมีไกลโคโปรตีน (cytosol- lutoidin binding protein, C-LBP) อีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถเกาะจับจำเพาะกับลูทอยดิน ได้เช่นกัน ดังนั้นจะเห็นว่าทั้ง RP-LBP และ C-LBP จะต้องแข่งขันกันเกาะจับจำเพาะกับลูทอยดิน และการจับกันระหว่าง RP-LBP ของอนุภาคยางกับลูทอยดิน เท่านั้น ที่จะนำไปสู่การเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่อกีดขวางการไหลของน้ำยาง นอกจากนั้นยังพบว่าระดับ C-LBP ในซี-ซีรั่มของน้ำยาง มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.97

ผลการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยางทั้งที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ซึ่งได้แก่ NAD(P)H ควิโนน รีดัสเตส, เปอร์ออกซิเดส กับโพลี่ฟีนอลออกซิเดส และที่ไม่ใช่เอนไซม์ แต่ก่อให้เกิดหรือยับยั้งการเหนี่ยวนำในการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางซึ่งได้แก่ ลูทอยดิน, RP-LBP และ C-LBP ที่พอจะสรุปได้มีดังนี้:

NAD(P)H ควิโนน รีดัสเตส (QR) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw จากการทำ IEF พบว่ามี QR หลายชนิด โดยมีค่า pI เท่ากับ 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 และ 7.4 โดยชนิดที่มีค่า pI เท่ากับ 6.2 จะมีปริมาณ QR แอคติวิตีสูงสุด โดยมีค่า M_r จากการทำ SDS-PAGE ประมาณ 57 kD QR มีความความจำเพาะต่อสัปสเตรทหลายชนิด ตามลำดับดังนี้ p-benzoquinone>menadione>plumbagin>juglone>duroquinone

ตามลำดับ โดยพบว่า dicumarol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ QR ส่วน pH ในการทำงานที่เหมาะสมที่สุดคือ 8 โดย QR สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH จากช่วง 6-10 และ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C

เปอร์ออกซิเดส สามารถเตรียมได้จากเปลือกนอกของไม้ยางที่ถูกเฉือนออกมาเวลากรีดยาง และพบว่าเปอร์ออกซิเดสนี้สามารถทำหน้าที่เปลี่ยน ฟีนอลจาก ซี-ซีรั่มในน้ำยาง ให้กลายเป็นโพลี่ฟีนอล เราสามารถทำให้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ได้โดยการแยกผ่าน คอลัมน์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางขนาด สภาพการมีประจุ และการเกาะจับจำเพาะของเอนไซม์ เมื่อทำบริสุทธิ์แล้วปรากฏว่าเปอร์ออกซิเดส มีค่า M_r จากการทำ SDS-PAGE และน้ำหนักโมเลกุลรวม จากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาด เท่ากับ 50 kD มีค่า pI เท่ากับ 3.5 และ การทำงานที่เหมาะสมที่ pH 5.4. ค่า K_m ต่อ สับสเตรท o-dianisidine และ H_2O_2 เท่ากับ 20 and 18.6 μM ตามลำดับ ค่า K_i ของตัวยับยั้ง KCN และ NaN_3 เท่ากับ 34 and 41 μM ตามลำดับ

โพลี่ฟีนอลออกซิเดส (PPO) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw โดยนำสารละลายที่ได้จากการละลายตะกอน B-serum ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ไปทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose จะได้ PPO I และ PPO II โดยมีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 kD ตามลำดับ และมีค่า pI เท่ากันคือ 9.3 ไอโซเอนไซม์ทั้งสองทำงานได้ดีในช่วง pH 5-8 โดยมีอุณหภูมิในการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 35-40°C และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C เมื่อใช้ dopamine และ L-dopa เป็นสับสเตรท PPO-I ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.08 และ 8.33 mM ส่วน PPO-II ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.12 และ 4.76 mM ตามลำดับ

ลูทอยดิน สามารถเตรียมได้จากอนุภาคลูทอยด์ ซึ่งแยกได้จากส่วนของ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยการนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปล้างแล้วสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2% Triton X-100 นำสารสกัดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยการแยกผ่านคอลัมน์ไคติน และ DEAE-Sepharose พบว่าลูทอยดินมีมีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 17 kD และ น้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยก โดยอาศัยขนาดประมาณ 276 kD ลูทอยดินสามารถทำให้อนุภาคยางเกาะกันเป็นกลุ่มได้ และตัวลูทอยดินเองยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจาก กระต่าย หรือ หนู เกาะกลุ่มได้ด้วย จึงมีคุณสมบัติเป็นเลคติน ซึ่งความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยไกลโคโปรตีนหลายชนิด คือ fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin ส่วน α_1 -acid glycoprotein หรือ น้ำตาลเดี่ยวหรือคู่หลายตัวจะไม่สามารถทำการยับยั้งดังกล่าวได้ ในทำนองเช่นกัน การเกาะจับของอนุภาคยางที่ถูกเหนี่ยวนำโดยลูทอยดิน จะสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย fetuin แต่ ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลเดี่ยว GlcNAC ลูทอยดินสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C และทนต่อความเป็นกรดด่างได้ดี ตั้งแต่ช่วง pH จาก 5-10

RP-LBP สามารถแยกได้จากชั้นบนสุดหรือชั้นของยางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยแยกเอาเฉพาะบริเวณ zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-serum ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวใส ไปทำบริสุทธิ์โดยการผ่านการล้างด้วย isotonic buffer หลังจากนั้นทำการสะกัด ด้วย 0.2% Triton X-100 นำสารที่สะกัดได้ไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน แล้วนำตะกอนที่ละลายได้ ไปอุ่นในน้ำเดือด 2 นาที แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยการแยกผ่านคอลัมน์ โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเป็นประจุที่แตกต่างกันของโปรตีน พบว่า RP-LBP ที่ทำบริสุทธิ์ได้ มีค่า M_r ที่ได้จากการทำ native PAGE และ SDS-PAGE เท่ากับ 120 และ 24.5 kD ตามลำดับ มีค่า pI เท่ากับ 5.4 และค่า pH ที่เหมาะสมกับการทำงานในช่วง 5-8 โดยสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 60°C ได้นานกว่า 30 นาที RP-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยลูทอยดิน โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ความเข้มข้นโปรตีนได้ต่ำสุด เมื่อเทียบกับไกลโคโปรตีนจากแหล่งอื่นๆที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถยับยั้งการทำงานของ RP-LBP

C-LBP สามารถแยกได้จากชั้นของส่วนใสในชั้นกลาง (ซี-ซีรั่ม) ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่องultracentrifuge โดยสามารถนำไปทำบริสุทธิ์ได้ ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเป็นประจุที่แตกต่างกันของโปรตีน พบว่า C-LBP มีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 40 kD และน้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาดประมาณ 204 kD มีค่า pI เท่ากับ 4.7 โดยสามารถทนความเป็นกรดด่างได้ตั้งแต่ช่วง pH 6-10 และ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 50°C C-LBP สามารถยับยั้งการการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางและเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยลูทอยดิน โดยพบว่าไคติเนสสามารถยับยั้งการทำงานดังกล่าวของ C-LBP ได้ ทำนองเดียวกันกับที่พบกับ RP-LBP นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณ C-LBP ในน้ำยางจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาตรน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีด

โดยสรุปกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยางในต้นยางพาราในขั้นแรกเกิดจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่สร้างสารพิษออกซิเจนเพื่อไปทำลายเสถียรภาพของเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์ทำให้ลูทอยด์แตก ขั้นถัดไปเกิดจากที่ลูทอยดินซึ่งโผล่ออกมาจากเมมเบรนของลูทอยด์หลังการแตก ไปทำหน้าที่เหมือนเลคตินในการจับจำเพาะกับไกลโคโปรตีนบนผิวอนุภาคยาง (RP-LBP) ก่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขัดขวางการไหลของน้ำยางและเกิดการอุดตันของท่อน้ำยางในที่สุด กลุ่มสารที่เกี่ยวข้องทั้งหมดนี้รวมเป็น coagulating factors ในทางกลับกันจะมีกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factors ซึ่งได้แก่ เปอร์ออกซิเดสและฟีนอลในซี-ซีรั่ม ที่ส่งผลต่อการลดการเกิดสารพิษออกซิเจน และไกลโคโปรตีน (C-LBP) ในซี-ซีรั่ม ที่ไปขัดขวางการเกาะกลุ่มระหว่างลูทอยดินกับอนุภาคยาง โดยพบว่าปริมาณ anti-coagulating factors เหล่านี้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด ซึ่งสมควรจะพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการไหลของน้ำยางในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไป

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging of *Hevea brasiliensis*

Rapepun Wititsuwannakul, *Dhirayos Wititsuwannakul, Piyaporn Pasitkul, Nopphakaew Chareonthipakorn and *Kamolchanok Rukseree

Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai.

*Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

****

Abstract

Rubber latex is a viscous white liquid synthesized and stored in latex vessel. Besides a major liquid cytosol (C-serum) content in rubber latex, various suspended particles, in decreasing quatities, are rubber particles, lutoids and Frey-Wyssling complex, respectively. Rubber tapping was performed by making cuts across latex vessels. The rubber tree has a mechanism to minimize its metabolite lost due to tapping by forming plug at the tapping site in order to retard latex flow. An early electron microscopic study revealed the presence of rubber particles and lutoid debris at the plugging site to impede latex flow. Our present study on the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* suggests the involvements of two cooperative processes. One is enzymatic dependent leading to lutoid bursting and another is non-enzymatic dependent involving specific aggregation between rubber particles and lutoid membrane debris.

Upon tapping, the opening end of latex vessel is exposed to atmospheric O_2 which in turn promotes activities of several oxidases leading to production of active oxygen species including superoxide ($O_2^{\cdot -}$) , hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) and H_2O_2 . These active oxygen species will cause lutoid membrane damage. The process may begin with reduction of quinone into semi-quinone by the NAD(P)H oxidase or NAD(P)H quinone reductase on lutoid membrane. In the presence of O_2, the semi-quinone can auto-oxidize into quinone by producing $O_2^{\cdot -}$. The reaction between $O_2^{\cdot -}$ with surrounding H_2O_2 results in formation of $OH^{\cdot}$ (Fenton & Haber-Weiss reaction). The $OH^{\cdot}$ will cause damage to the unsaturated double bond of fatty acid in lutoid membrane and lead to membrane breakage. Consequently, peroxidase and polyphenol oxidase in latex cytosol will utilize H_2O_2 and O_2, respectively to oxidize hydroquinoe subtrate into its corresponding quinone product, hence increasing further chance on semi-quinone and active oxygen species production. However, opposite outcome may also

occur if there are other substrates such as C-serum phenols competing with hydroquinone for these enzymes. Whichever substrate is utilized, the reactions catalyzed by peroxidase and polyphenol oxidase will result in decreasing H_2O_2 and O_2 contents, respectively. Accordingly, we found direct correlations between level of bark peroxidase and C-serum phenols with rubber yield per tapping, r=0.76 and 0.91, respectively.

The bursting of lutoid will lead to an exposure of lutoidin, possesing lectin activity, on its membrane. The lutoidin will agglutinate particle particles. The aggregation of rubber particles is a non-enzymatic process involving recognition of glycoprotein (rubber particle-lutoidin binding protein, RP-LBP) on rubber particle by its receptor site on the lutoidin. These specific bindings led to rubber plug formation in latex vessel to retard flow. The agglutination of rubber particles can be demonstrated *in vitro* by mixing lutoidin, purified from lutoid membrane with rubber particles. In the *in vivo* situation, after lutoid breakage its membrane debris remained suspending in latex cytosol where another glycoprotein that can bind to lutoidin (cytosol- lutoidin binding protein, C-LBP) was also found. Therefore, it is seen that both RP-LBP and C-LBP will have to compete for lutoidin binding and only with the former that rubber particle aggregation can be formed to impede latex flow. Accordingly, the level of C-LBP is directly proportional to rubber latex yield per tapping, with r=0.97.

The results obtained from purification and chracterizations of proteins involved in latex vessel plugging on the enzymatic process including NAD(P)H quinone reductase, peroxidase and polyphenol oxidase and the non-enzymatic process leading to rubber particle aggregation including lutoidin, RP-LBP and C-LBP can be summarized as follows:

NAD(P)H quinone reductase (QR) was prepared from B-serum, obtained from bottom fraction of ultracentrifuged fresh latex, by repetitive freeze-thawing. Upon IEF, several QRs were found with pIs of 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 and 7.4 The most dominant form of QR possesed pI value of 6.2 and M_r of 57 kD upon SDS-PAG. Different substrate specificities on QR were detected as follows: p-benzoquinone>menadione>plumbagin>juglone>duroquinone, respectively. Dicumarol was found to inhibit QR activity. Optimum pH was observed at 8 while pH stability ranging from 6-10. QR is heat stable up to 70°C.

Peroxidase was prepared from excised *Hevea* bark strips obtainded after tapping. The bark peroxidase was capable to convert phenols isolated from C-serum fraction of centrifuged latex into polyphenolic forms. The peroxidase was purified to homogeneity by size exclusion, ion exchange and affinity chromatography. SDS-PAGE and gel filtration chromatography

indicates that purified peroxidase is composed of a single polypeptide of M_r 50 kD. The enzyme has a pI of 3.5. The K_m values for o-dianisidine and H_2O_2 were 20 and 18.6 μM, respectively, and the K_i values for KCN and NaN_3 for these substrates were 10 μM and 2.7 mM, respectively.

Polyphenol oxidase (PPO) was prepared from B-serum by repetitive freeze-thawing of bottom fraction obtained from ultracentrifuged fresh latex. The B-serum was subjected to acetone precipitation and the solubilized precipitate was further purified through CM-Sepharose column. Two PPO were obtained, PPO-I and PPO-II with M_r under SDS-PAGE of 32 and 34 kD, respectively. Both PPOs possess pI of 9.3 and have optimum pH and temperature ranging from 5-8 and 35-40°C, respectively. They are heat up to 60°C. The K_ms values of PPO-I for dopamine and L-dopa are 2.08 and 8.33 mM, respectively while those for PPO-II are 2.12 and 4.76 mM , respectively.

Lutoidin was isolated from lutoid (bottom) fraction of centrifuged rubber latex under acetone precipitation. Lutiodin was extracted from the acetone precipitate in buffer containing 0.2% Triton X-100 and purified to homogeneity after chitin and DEAE-Sepharose column. The M_r upon SDS-PAGE is 17 kD with native M_r obtained by gel filtration of 276 kD It is able to agglutinate rubber particles and erythrocytes from either rabbit or mouse. The hemagglutination or lectin activity of lutoidin can be inhibited by several glycoproteins such as fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin but not α_1 -acid glycoprotein , mono- or di-saccharides. Similarly, the ability of lutoidin in inducing rubber particle aggregation was also inhibited by fetuin but not monosugar like GlcNAC. Lutoidin is heat stable up to 60°C and its pH stability ranging from 5-10.

RP-LBP was isolated from rubber layer obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The zone 2 of rubber layer facing aqueous C-serum phase with white jelly-like appearance was isolated and washed with isotonic buffer. RP-LBP was then extracted in the presence of 0.2% Triton X-100. Acetone precipitation was performed on the extract and resultant pellet was solubilized and dipped in boiling water for 2 min. RP-LBP was further purified from supernatant obtained after heat-treatment by passing through gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified RP-LBP possessed M_r of 120 and 24.5 kD upon native PAGE and SDS-PAGE, respectively. The pI value was determined to be 5.4 while pH optimum ranging from 5-8. It could stand heat at 60°C for more than 30 min. The RP-LBP

was able to inhibit hemagglutination induced by lutoidin with highest binding efficiency since its concentration required for inhibition was lowest in comparison with other glycoprotein inhibitors used under the same study. In addition, the lutoidin binding capacity of RP-LBP was abolished upon chitinase treament.

C-LBP was purified from C-serum fraction in middle aqueous phase obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The purification procedure involved ammonium sulfate fractionation, gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified C-LBP possessed M_r of 40 kD upon SDS-PAGE. The native molecular weight obtained after gel filtration was 204 kD. The pI value was around 4.7 while a broad range of pH atibility was observed from 6-10. It is heat stable up to 50°C. Purified C-LBP could inhibit both rubber particle aggregation and hemagglutination induced by the lutoidin. These inhibitions are, however, abolished with pre-treatment of C-LBP with chitinase, similar to that observed with RP-LBP. Moreover, a direct correlation between latex C-LBP level and rubber latex yield per tapping was also found.

In conclusion, the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* begins with the production of active oxygen species by a group of oxidase enzymes. These destructive active oxygen species then causes lutoid membrane destabilization leading to an exposure of lutoidin. The lutodin, also possessed lectin activity, will agglutinate rubber particles by binding specifically with glycoprotein (RP-LBP) on rubber particle surface. The aggregate thus formed will impede or eventually cease latex outflow. Overall compounds involved in this process are functioning as coagulating factors. On contrary, there is also a group of anti-coagulating factors such as peroxidase and C-serum phenol playing role in reducing the amount of active oxygen species and C-serum glycoprotein (C-LBP) which competes with RP-LBP in binding with lutoidin in forming rubber particle aggregate. It was found that the levels of these anti-coagulating factors are directly and highly correlated to the amount of latex yield per tapping. Hence, the anti-coagulating factors should be applied as potential markers in characterization and selection of better-yield rubber clones.