



**RUBBER BIOSYNTHESIS BY LUTOID MEMBRANE  
IN *HEVEA* LATEX**

**ATIYA RATTANAPITTAYAPRON**

**With compliments**

of

*Faculty of Graduate Studies*  
**MAHIDOL UNIVERSITY**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(BIOCHEMISTRY)**

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**1998**

**ISBN 974-589-769-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

3736290 SCBC/M : MAJOR : M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

KEY WORD : *Hevea brasiliensis* / LATEX / RUBBER / RUBBER  
BIOSYNTHESIS / INTACT WASHED LUTOID PARTICLE /  
LUTOID MEMBRANE / ISOPENTENYL DIPHOSPHATE /  
RUBBER SYNTHASE / PRENYL TRANSFERASE

ATIYA RATTANAPITTAYAPRON : RUBBER BIOSYNTHESIS BY LUTOID  
MEMBRANE IN *HEVEA* LATEX.

THESIS ADVISOR : DHIRAYOS WITITSUWANNAKUL Ph.D.,  
RAPEPUN WITITSUWANNAKUL Ph.D., PRAYAD KOMARATAT Ph.D.  
127 p. ISBN 974-589-769-8

We have recently found that new rubber formation occurred in the bottom fraction of centrifuged latex. The *in vitro* rubber biosynthesis was detected by incorporation of  $^{14}\text{C}$ -isopentenyl diphosphate ( $^{14}\text{C}$ -IDP) into the newly formed rubber. The intact washed lutoid particles and the lutoid membrane were both active for rubber biosynthesis process in the assay mixture containing  $\text{Mg}^{2+}$ , dithiothreitol (DTT), and  $^{14}\text{C}$ -IDP in Tris buffer pH 7.7. A direct linear relationship was found between the amount of intact washed lutoid particles or lutoid membrane and the  $^{14}\text{C}$ -IDP incorporation into the new rubber isolate. Both EDTA and EGTA were able to inhibit the new  $^{14}\text{C}$ -rubber formation by either intact washed lutoid particles or lutoid membrane. The presence of ionic detergent (SDS) was found to stimulate the  $^{14}\text{C}$ -rubber formation while the non-ionic detergents (Triton X-100 and Tween 20) showed no effect. The amount of rubber formation increased with the increasing SDS at above critical micelle concentration, suggesting the role of micelle in the rubber biosynthesis process. High temperature was also found to have stimulation effect. Heat pretreatment of either intact washed lutoid particles or lutoid membrane led to a large increase of new  $^{14}\text{C}$ -rubber being formed. Heat activation of lutoid membrane in the presence of SDS was higher than without SDS, indicating additive effect of both on rubber biosynthesis. The SDS effect was both qualitative and quantitative, resulting in the lower temperature of activation with higher increase of rubber biosynthesis activity. Isolation and partial purification of the lutoid membrane proteins for rubber biosynthesis process showed the active protein fraction was obtained after 20% acetone fractionation. Two major protein bands with subunit molecular weight of 30 -40 kD were found in the active fraction together with other minor proteins. The exact role of each protein and enzyme in the active fraction for rubber biosynthesis was not yet known and needed further clarification.

These *in vitro* rubber biosynthesis findings indicate the important role of lutoid membrane in this process. The active role of lutoid membrane in rubber biosynthesis process was by criteria of the membrane activity in many aspects such as the membrane nature, the lutoid membrane proteins and the activation by both heat and ionic detergent. It remains to be further delineated.

3736290 SCBC/M : MAJOR : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

อริยา รัตนพิทยากรณ์ :ชีวสังเคราะห์ยางโดยเมมเบรนจากอนุภาคลูทอยด์ในน้ำยางพารา  
(Rubber Biosynthesis by lutoid membrane in *Hevea latex*)

อาจารย์ที่ปรึกษา: ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D. ,รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล Ph.D. ,  
ประหยัด โกมารทัต Ph.D.

127 หน้า. ISBN 974-589-769-8

การศึกษาเกี่ยวกับขบวนการชีวสังเคราะห์ยางในน้ำยางพาราภายในหลอดทดลองที่ผ่านมา พบว่ามีการสังเคราะห์ยางใหม่เกิดขึ้นจากส่วน bottom fraction ของน้ำยางพาราที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifuge) การเกิดยางใหม่ในขบวนการนี้สามารถตรวจสอบได้จากกรที่มีสารกัมมันตรังสี ( $^{14}\text{C}$ -isopentenyl diphosphate) ถูกเติมเข้าไปในโมเลกุลของอนุภาคยางที่เกิดขึ้นใหม่

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาชีวสังเคราะห์ยางจากอนุภาคลูทอยด์ และเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์โดยตรง พบว่าทั้งคู่อุณหภูมิการเกิดชีวสังเคราะห์ยางในปริมาณที่มากกว่าที่เคยพบจากชีวสังเคราะห์ยางในส่วน bottom fraction และปฏิกิริยาของขบวนการนี้ถูกขัดขวางโดยการเติม EDTA และ EGTA ลงในหลอดทดลอง สำหรับการเติม detergent ลงในหลอดทดลอง พบว่า nonionic detergent ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาในขบวนการนี้ ต่างกับ ionic detergent (SDS) ซึ่งสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาให้เกิดการสังเคราะห์ยางใหม่ได้มากขึ้นในกรณีที่ใช้ปริมาณสูงกว่า critical micelle concentration ส่วนตัวแปรทางด้านอุณหภูมินั้น พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยางได้เช่นกัน โดยถ้าใช้ทั้งอุณหภูมิสูงและเติม SDS ลงในหลอดทดลองด้วยจะเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่าเมมเบรนจากอนุภาคลูทอยด์มีปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยางสูงกว่าอนุภาคลูทอยด์ และจากการสกัด โปรตีนจากเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์โดยใช้ acetone พบว่าเมื่อนำส่วนของโปรตีนที่มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์ยางไปแยกแถบโปรตีน (SDS-PAGE) จะพบแถบโปรตีนจำนวนหลายแถบ โดยแถบที่มีปริมาณมากที่สุดจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 -40 kD