Agricultural Sci. J. 47 : 3 (Suppl.) : 189-192 (2016) ว. วิทย. กษ. 47 : 3 (พิเศษ) : 189-192 (2559)

การมีแอลกอฮอล์แอซีทิลแทรนสเฟอเรสและสารตั้งต้นที่จำเพาะในผลการเวกสุก

Presence of Alcohol Acetyltransferase and their Substrate Specificity in Ripe Karawek (*Artabotrys siamensis*) Fruit

วณิชยา ผดุงฮะ[1] สมโภชน์ น้อยจินดา[1] กิตติ โพธิปัทมะ[1] หัตถ์ชัย กสิโอฬาร[2] และ เฉลิมชัย วงษ์อารี[3]

Wanichaya Padungha[1], Sompoch Noichinda[1], Kitti Bodhipadma[1], Hattachai Kasiolarn[2] and Chalermchai Wongs-Aree[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่ากลิ่นของผลการเวกมีเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก เหมือนกับกลิ่นในดอกการเวกและกระดังงาจีน เท่าที่ผ่านมายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบกลิ่นของผลการเวกและกิจกรรมของแอลกอฮอล์แอซีทิลแทรนสเฟอเรส (AAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์กลิ่นเอสเทอร์ในพืช ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ จึงต้องการศึกษาเอสเทอร์ในองค์ประกอบของกลิ่น และแอลกอฮอล์ตั้งต้นที่จำเพาะต่อ AAT ในผลการเวก ทำการเก็บเกี่ยวผลการเวกผลการเวกแก่เต็มที่ระยะต่าง ๆ (จากเขียวซึ่งแก่เต็มที่ไปจนถึงเหลืองสุกเต็มที่) สกัด และวัดกิจกรรมของ AAT โดยเติมลงในปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์หลายชนิดกับ acetyl CoA ผลการทดลองพบว่า AAT ปรากฏในผลตั้งแต่ระยะแก่เต็มที่จนกระทั่งสุกเต็มที่ โดย AAT ในผลการเวกสามารถใช้สารตั้งต้นแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด (จาก C1 ถึง C6) ในการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยเมทานอลเป็นสารตั้งต้นที่ AAT ใช้มากที่สุด ในขณะที่ benzyl acetate สามารถถูกสังเคราะห์ได้จาก benzyl alcohol กับ acetyl CoA โดยมี AAT เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้น AAT ซึ่งมีในผลการเวกตั้งแต่ระยะแก่เต็มที่สามารถใช้สารตั้งต้นแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด

คำสำคัญ: AAT, ผลการเวก, เอสเทอร์

Abstract

A preliminary study showed that Karawek (*Artabotrys siamensis*) fruit volatiles contained high amounts of esters which were similar to those of Karawek and Kradang Nga Chin (*A. hexapetalus*) flowers. So far, there has been no report on Karawek fruit volatile component and the activity of acetyltransferase (AAT), which is an important ester biosynthetic enzyme in plants. Therefore, the aim of this research was to investigate the volatile esters and alcohol substrate specificity of Karawek fruit-AAT. Karawek fruits were harvested at different maturity stages (from mature-green to fully ripe or yellow and AAT was subsequently extracted and its activity assayed by adding to the reactions of various alcohols and acetyl CoA. The results revealed that AAT existed in the fruit from mature green to fully ripe stages. Karawek fruit-AAT could use a number of alcohol substrates (from C1 to C6) for ester synthesis. Methanol was the most preferred substrate for this enzyme while benzyl acetate was also synthesized from benzyl alcohol and acetyl CoA with AAT being the catalyst. Hence, Karawek fruit-AAT existing from the mature green stage was able to use several kinds of alcohol substrates.

Keywords: AAT, Karawek fruit, ester

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ บางซื่อ กรุงเทพฯ 10800 ประเทศไทย

[1]Division of Agro-Industrial Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Banhsue, Bangkok 10800, Thailand

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520 ประเทศไทย

[2]Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520 Thailand

[3]สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 ประเทศไทย

[3]Postharvest Technology Program, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkhuntien Campus, Bangkok 10150, Thailand

Introduction

Plants in the family Annonaceae can be classified into 130 genera and 2,300 species. Karawek (*Artabotrys siamensis*), a member of this family, is a climbing shrub native to Thailand (Charlermklin, 2001). The blooming flower of this plant has a strong fruity fragrance which particularly consists of 2-methylpropyl acetate, ethyl acetate and ethyl 2-methylbutanoate (Padungha *et al*., 2014). Based on our preliminary study, Karawek fruit also produced abundant ester volatiles (Padungha *et al*., 2014). Typically, the biosynthesis of esters in plants was the enzymatic reaction of alcohol and acyl CoA. Alcohol acetyltransferase (AAT) plays an essential role in the final step of ester synthesis. It was explored from numerous ripe fruits, for example apple (Fellman *et al*., 1993) and strawberry (Perez *et al*., 1996) and blooming flowers, such as gypsophilla (Nimitkeatkai *et al*., 2006) and rose (Shalit *et al*., 2003). Most of them give off differ ester components meaning that they utilize different kinds of alcohol for ester synthesis. Hence, our purpose of conducting this research was to examine the volatile esters and alcohol substrate specificity of Karawek fruit-AAT.

Materials and Methods

Karawek fruits were (Figure 1) harvested at various stages: 100% green, 25% yellow, 50% yellow, 75% yellow and 100% yellow. AAT was extracted according to the method outlined by Perez *et al*. (1996) 25 g pulp mixed in 4 g polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), 33 ml of 0.2 M phosphate buffer pH8 and 0.1% Tween 20, then ground in a mortar with pestle. The suspension of ground solution was filtered with Whatman No. 1 filter paper. All investigation steps were operated at 4°C. The pellet was washed twice with 8 ml of 0.2 M phosphate buffer pH 8, then centrifuged at 27,000*g* for 20 min. The supernatant was used to measure AAT activity.

For measuring AAT activity, 100 µl of AAT-extracted solution was mixed in 750 µl of 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 10 µl of 10.6 mM $MgCl_2$. The solutions were shaken well before adding 20 µl of 10 mM methyl alcohol and 20 µl of 0.3 mM acetyl CoA, respectively, and kept at room temperature for 10 min before adding 100 µl Ellman's reagent (20 mM 5'5 -dithiobis-nitrobenzoic acid, DTNB). After five min, the release of thiophenol (CoASH reacted with DTNB) considered as AAT activity was spectrophotometrically measured at 412 nm. The above method was repeated but ethyl alcohol, propyl alcohol, butyl alcohol, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol, n-amyl alcohol, hexyl alcohol or benzyl alcohol, respectively, instead of methyl alcohol. Protein was finally measured using the method of Bradford (1976).

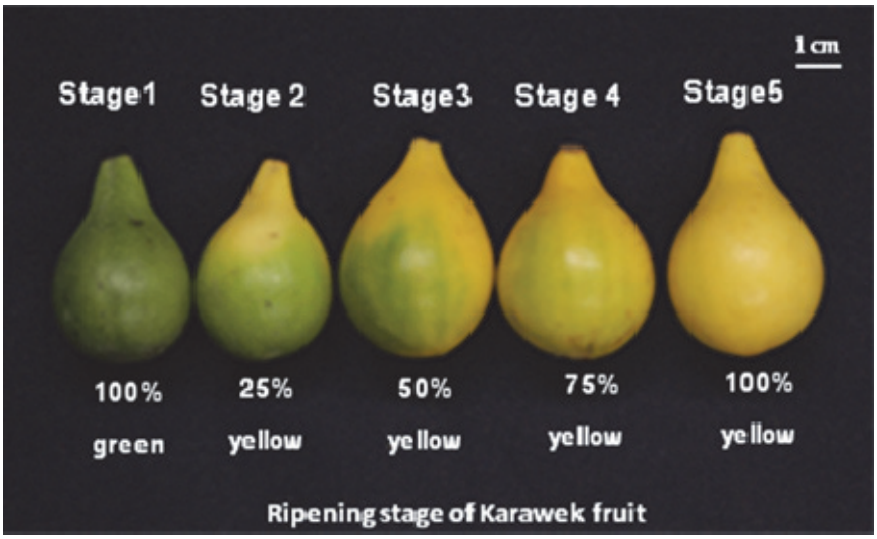

Figure 1 Karawek fruits at various stages

Results and Discussion

For the alcohol specificity of Karawek AAT, methyl alcohol was the most preferred substrate among all the tested alcohols (Figure 2 and Table 1) which were related to Karawek aroma profile resulting from GC-MS. Karawek fruit at stage 4 (75% yellow) produced the amount highest rate of ester with methyl alcohol followed by propyl alcohol, isoamyl alcohol and ethyl alcohol, respectively. AAT existed in Karawek fruit from the mature-green stage but its activity was highest in ripe fruit (stage 4) and declined in over ripe fruit. However, Karawek flower volatiles contained high amounts of 2-methylpropyl acetate and ethyl acetate (Padungha *et al*., 2015). Since methyl acetate and ethyl acetate were abundant in Kradang Nga Chin aroma flower (Mahidol *et al*., 2005; Noichinda *et al*., 2015), it was possible to conclude that Karawek fruit volatile was similar to Kradang Nga Chin flower volatile.

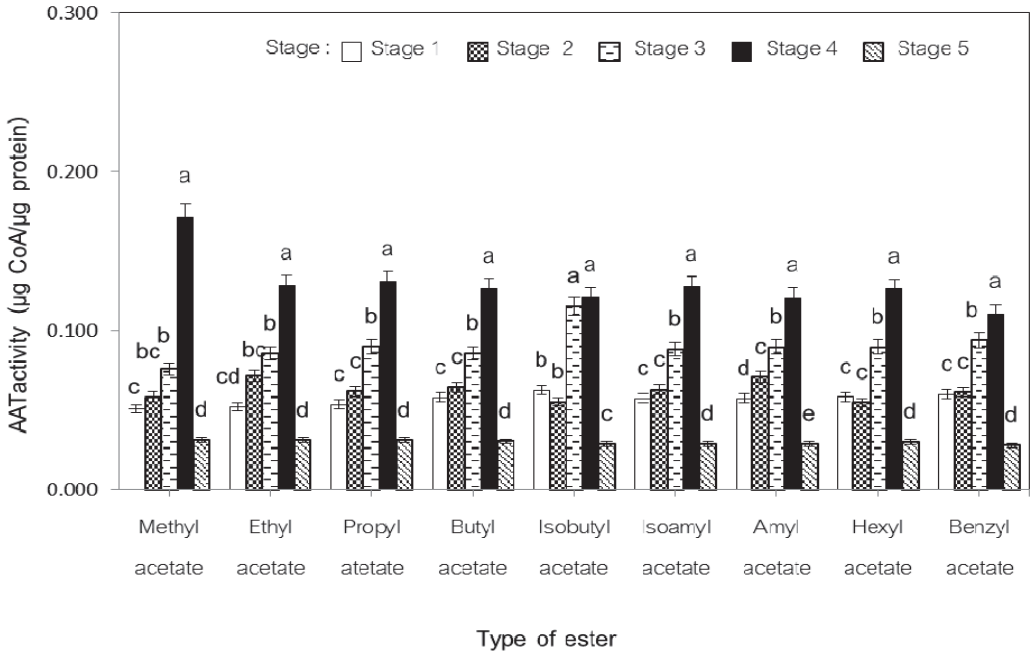

Figure 2 Alcohol acetyltransferase activity of Karawek fruit at different stages

Table 1 Substrate specificity of Karawek fruit AAT at different stages

Alcohol	Acetate ester formation (µg CoA/µg protein)				
	Stage of Karawek fruit				
	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5
Methyl alcohol	0.051±0.006c	0.058±0.009bc	0.076±0.011b	0.171±0.023a	0.031±0.004d
Ethyl alcohol	0.52±0.004cd	0.072±0.030bc	0.086±0.003b	0.128±0.009a	0.031±0.001d
Propyl alcohol	0.054±0.008c	0.062±0.005c	0.090±0.009b	0.131±0.015a	0.0031±0.001d
Butyl alcohol	0.058±0.002c	0.064±0.007c	0.086±0.002b	0.126±0.004a	0.030±0.001d
Isobutyl alcohol	0.063±0.005b	0.055±0.010b	0.115±0.010a	0.121±0.002a	0.029±0.001c
Isoamyl alcohol	0.057±0.003c	0.063±0.006c	0.088±0.003b	0.128±0.008a	0.029±0.002d
Amyl alcohol	0.057±0.006d	0.071±0.019c	0.090±0.004b	0.121±0.001a	0.029±0.001e
Hexyl alcohol	0.058±0.005c	0.055±0.014c	0.090±0.005b	0.126±0.012a	0.030±0.001d
Benzyl alcohol	0.60±0.006c	0.061±0.004c	0.094±0.11b	0.110±0.005a	0.028±0.002d

Literature cited

Bradford, M.M. 1976. A lipid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Charlermklin, P. 2001. Annonaceous Plants. Amarin Printing & Publishing Public Company Limited, Bangkok. 368 p. (in Thai)

Fellman, J.K., D.S. Mettinson and B.C. Bostick. 1993. Ester biosynthesis in rome apple subjected to low-oxygen atmospheres, Postharvest Biology and Technology 3: 201-214.

Mahidol, C., N. Chimnoi, D. Chokchaichamnankit and S. Techasakul. 2005. Identification of volatile constituents in *Artabotrys hexapetalus* flowers using simple headspace solvent-trapping technique in combination with gas chromatography-Mass Spectrometry and Retention Indices. Acta horticulturae 677: 43-50.

Nimitkeatkai, H., Y. Ueda, K. Inamoto and M. Doi. 2006. Ester formation and substrate specificity of alcohol acetyltransferase in cut flowers of gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.). Journal of the japanese society for horticultural science 75: 148-153.

Noichinda, S., K. Bodhipadma, C. Yeangmanit, J. Siritikul and C. Wongs-Aree. 2015. Ester: a typical odor of Kradang Nga Chin (*Artabotrys hexapetallus*) flower. Agricultural science journal 46(3): 864-866.

Padungha, W., S. Noichinda, K. Bodhipadma, C. Jirapong and C. Wongs-Aree. 2014. Evaluation of ester volatiles in Karawek (*Artabotrys siamensis*) flower. Agricultural science journal 45(2): 413-416.

Perez, A.G., C. Sanz, R. Olias, J. Rios and J.M. Olis. 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. Journal of agriculture and food chemistry 44(10): 3286-3290.

Shalit, M., I. Guterman, H. Volpin, E. Bar and T. Tamari. 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose oetals. Plant physiology 131(4): 1868-1876.