Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 127-130 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 127-130 (2551)

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ alcohol acyltransferase ของแตงเมลอนพันธุ์ลูกผสมระหว่างการพัฒนาผล
Evolution of hybrid netted melon during fruit development

ภูวนาท ฟักเกตุ[1,2] เฉลิมชัย วงษ์อารี[1,2] คิน เลย์ คู[1] สมโภชน์ น้อยจินดา[3] และ ศิริชัย กัลยาณรัตน์[1,2]
Puwanart Fuggate[1,2] Chalermchai Wongs-Aree[1,2] Khin Lay Kyu[1] Sompoch Noichinda[2] and Sirichai Kanlayanarat[1,2]

Abstract

Esters are a crucial group of aroma volatiles, contributing an unique phenotype and customer characteristics in fruits of the CUCURBITACEAE family. Analysis of volatiles and alcohol acetyltransferase (AAT) activity producing esters by utilizing acetyl-CoA to acetylate alcohols was conducted from hybrid netted melon (*Cucumis melo* L. cv. 'Kuylin') during fruit development. The enzyme activities were carried out in cell-free extracts derived from melon mesocarp where various aliphatic alcohols were applied as exogenous substrates. Volatile aldehydes and alcohols were most abundant in fruit at pre-climacteric stage (30 and 35 days after anthesis; DAA). The levels of AAT activity could not be detected in mature fruit at 30 and 35 DAA but steadily increased during the early stages of ripening (40-45 DAA) and then clearly decreased at the overripe stage (50 DAA). Straight chain esters, hexyl acetate and butyl acetate, and branched-chain esters, 2-methylpropyl acetate and 2-methylbutyl acetate, found to be the major esters in fruit extracts were detected using head space solid phase microextraction/ gas chromatography/mass spectrometry (HS-SPME/GC/MS) technique. While long aliphatic chain esters predominated during the early stages of ripening and ripening (40-45 DAA), short chain esters increased later in proportion. As a result, AAT activities for which they were supplied by exogenous substrates emerged at late stages of fruit development.

Keywords: hybrid netted melon, fruit development, alcohol acetyltransferase

บทคัดย่อ

เอสเทอร์เป็นสารหอมระเหยกลุ่มสำคัญต่อลักษณะปรากฏและคุณลักษณะการบริโภคของผลในพืชตระกูลแตง จากการวิเคราะห์สารหอมระเหยและกิจกรรมของเอนไซม์ alcohol acetyltransferase (AAT) (ซึ่งผลิตสารเอสเทอร์โดยนำหมู่อะซิทิลมาต่อกับแอลกอฮอล์) จากผลเมลอนพันธุ์ลูกผสม (พันธุ์กุ้ยหลิน) ในระหว่างการพัฒนาของผล โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะตรวจสอบจากสารสกัดจากเนื้อเยื่อ mesocarp ที่เติมแอลกอฮอล์สายตรงหลากหลายชนิดลงไป พบว่าอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์มีปริมาณมากในผลเมลอนช่วงก่อนถึงระยะบริบูรณ์ที่อายุ 30 และ 35 วันหลังผสมเกสร โดยตรวจไม่ พบกิจกรรมของเอนไซม์ AAT ในผลที่อายุ 30 และ 35 วันหลังผสมเกสร แต่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงที่เริ่มสุกแก่ (40-45 วันหลังผสมเกสร) แล้วลดลงอย่างมากในผลที่สุกงอม (50 วันหลังผสมเกสร) การตรวจสอบสารเอสเทอร์จากสารสกัด โดยวิธี head space solid phase microextraction/ gas chromatography/mass spectrometry (HS-SPME/GC/MS) แสดงให้เห็นว่าเอสเทอร์สายตรงคือ hexyl acetate และ butyl acetate และเอสเทอร์ที่เป็นกิ่งก้านคือ 2-methylpropyl acetate และ 2-methylbutyl acetate เป็นเอสเทอร์หลักจากปฏิกิริยา ซึ่งเอสเทอร์สายยาวพบมากในผลที่เริ่มสุกจน ถึงสุกแก่เต็มที่ (40-45 วันหลังผสมเกสร) ส่วนเอสเทอร์สายสั้นมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นหลังจากระยะนี้ ดังนั้นเอนไซม์ AAT จากการตรวจสอบโดยการใช้สับเสตรทจากภายนอกแสดงถึงการมีกิจกรรมสูงมากในช่วงปลายของการพัฒนาผล

คำสำคัญ: เมลอนพันธุ์ลูกผสม, การพัฒนาของผล, alcohol acetyltransferase

[1] คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
[1] School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkhuntein Campus, Bangkok 10150
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
[2] Postharvest Technology Innovation Center, King Mongkut's University of Technology Thonburi
[3] คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ 10800
[3] Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok 10800

คำนำ

แตงเมลอนหรือแตงเทศ (*Cucumis melo* L.) จัดเป็นพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) มีผิวผลเป็นตาข่ายทำให้ดึงดูดผู้บริโภค อีกทั้งเนื้อในมีรสชาติดี หวาน และมีกลิ่นหอม เป็นที่รู้จักและนิยมทั้งในและต่างประเทศ (กมล และคณะ, 2535) โดยสารระเหยในกลุ่มเอสเทอร์เป็นสารประกอบที่สำคัญต่อลักษณะปรากฏและคุณลักษณะการบริโภคของผลในพืชตระกูลแตง และบางชนิดอาจมีความสำคัญต่อลักษณะเฉพาะของผลไม้ชนิดนั้นๆ อีกด้วย (Homatidou และคณะ, 1992) สำหรับเอสเทอร์ในแตงเมลอนนั้นส่วนใหญ่มาจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดสายตรง (aliphatic acid) และเปลี่ยนไปเป็นเอสเทอร์หรืออซิเตท (acetate) ซึ่งองค์ประกอบหลักของสารดังกล่าวประกอบด้วยกรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีเอนไซม์ alcohol acyltransferase (AAT) เป็นตัวเร่งให้เกิดการสังเคราะห์สารระเหยในกลุ่มเอสเทอร์ ซึ่งเกิดการทำปฏิกิริยาจากสารตั้งต้นระหว่าง acyl-CoA กับแอลกอฮอล์ (Shalit และคณะ, 2001) ในปี 1976 Yamashita และคณะรายงานว่าการสังเคราะห์สารระเหยเอสเทอร์ในผลสตรอเบอรี่มาจากแอลดีไฮด์ในระหว่าง การบ่มผลสตรอเบอรี่ทั้งผล และต่อมา Ueda และ Ogata (1977) พบว่าการสังเคราะห์สารระเหยเอสเทอร์ในกล้วยจะต้องมี Co-enzyme A ร่วมใน ปฏิกิริยาด้วย ซึ่งการเกิดสารดังกล่าวมาจากการเติมแอลกอฮอล์ลงไปในเซลล์เนื้อเยื่อของกล้วย สตรอเบอรี่ และเมลอน แม้ว่าจะนานมากกว่าจะทราบผลดังกล่าว ซึ่งก่อนหน้านี้พบแต่เพียงว่ามีเอนไซม์ AAT เท่านั้นที่พบ ในกล้วย Perez และคณะ (1996) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารระเหยในผลสตรอเบอรี่พันธุ์ “Chandler” ในระหว่างการสุก และกรดอะมิโนอิสระที่เป็นองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารหอมระเหย ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาสารตั้งต้นที่ มีความจำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ AAT ในแตงเมลอนพันธุ์ลูกผสม (พันธุ์กุ้ยหลิน) และลักษณะการเปลี่ยนรูปของสาร หอมระเหยในกลุ่มเอสเทอร์ในระหว่างการพัฒนาผล

อุปกรณ์และวิธีการ

คัดเลือกผลแตงเมลอนจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครสวรรค์ที่ระยะ 30, 35, 40, 45 และ 50 วันหลังผสมเกสร และเก็บเกี่ยวโดยตัดให้มีขั้วของผลและส่วนของเถาแขนงติดอยู่เป็นรูปตัวที ห่อผลด้วยตาข่ายโฟม แล้วมาขนส่งมายังห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (วิทยาเขตบางขุนเทียน) หลังจากนั้นนำผลมาล้างด้วยน้ำประปาปอกเอาเปลือกและเมล็ดออก แล้วหั่นเนื้อให้ออก เป็นชิ้นๆ นำเนื้อในส่วน mesocarp จำนวน 1-2 (กิจกรรมของ AAT), 5 (สารหอมระเหย) และ 20 กรัม (ปริมาณแอลกอฮอล์) มาใช้ในการทดลอง โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ AAT ดัดแปลงจากวิธีการของ Perez และคณะ (1996) และ Shalit และคณะ (2001) ส่วนการวิเคราะห์สารหอมระเหยด้วยวิธี head space solid phase microextraction (HS-SPME) โดยใช้เนื้อ mesocarp บดให้ละเอียดแล้วใส่ขวด headspace vial ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาและดูดซับสารหอมระเหยด้วยไฟเบอร์ชนิด polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) หนา 65 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารหอมระเหยง่ายโดยใช้เครื่อง GC-MS ของ Agilent รุ่น 6850 และ MSD รุ่น 5973 โดยใช้คอลัมน์ (HP-5MS) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยปรับสภาวะของเครื่อง GC ให้ injection port มีอุณหภูมิ 200°C ในระบบ splitless mode อุณหภูมิ oven เริ่มต้น 50°C คงที่นาน 1 นาที และจะเพิ่มขึ้นเป็น 120°C จนถึง 250°C ด้วยอัตรา 10°C ต่อนาที ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา (carrier gas) ที่อัตราการไหล 2 มิลลิเมตรต่อนาที ความดัน 15.9 psi การชี้เฉพาะสารหอมระเหยทำโดยเปรียบเทียบกับ spectra ของสาร แต่ละตัวกับฐานข้อมูล NIST98 Library สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ใช้วิธีการของ Davis and Chase (1969)

ผลและวิจารณ์ผล

สารหอมระเหยที่พบจากเนื้อ mesocarp ของแตงเมลอนในช่วงของการพัฒนาผลส่วนใหญ่ที่พบคือ เอสเทอร์ และปริมาณเอสเทอร์ทั้งหมดและอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นหลังจากมีการเพิ่มขึ้นของเอทิลีนภายในผลอย่างรวดเร็ว สำหรับใน ช่วง climacteric peak จะมีการผลิตเอทิลีนภายในผลสูงสุดซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเอสเทอร์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงดัง กล่าว (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งสารหอมระเหยจะยังการผลิตอย่างต่อเนื่องแม้ผลไม้จะหลุดออกจากต้นแล้ว (Yabumoto และคณะ, 1977) ส่วนแอลดีไฮด์พบเฉพาะในช่วงก่อนถึงระยะบริบูรณ์ที่อายุ 30 และ 35 วันหลังผสมเกสร ได้แก่ hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-6-nonenal, (*E*,*Z*)-2,6-nonadienal และ 2-nonenal (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งสารระเหยดังกล่าวเป็น ลักษณะเฉพาะในพืชตระกูล Cucurbitaceae เรียกว่า “green nose” (Schieberle และคณะ 1990) สารหอมระเหย ที่พบหลังจากผลเมลอนเริ่มมีการผลิตเอทิลีน (40 วันหลังผสมเกสร) และช่วงหลังระยะ climacteric phase (45 และ 50 วันหลังผสมเกสร) คือ เอสเทอร์

สายตรง (hexyl acetate และ butyl acetate) และเอสเทอร์ที่เป็นกิ่งก้าน (2-methylpropyl acetate และ 2-methylbutyl acetate) มีปริมาณเพิ่มขึ้นจนผลสุกงอม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) Buttery และคณะ (1982) รายงานว่าปริมาณของ acetaldehyde, ethanol, methyl acetate, ethyl acetate, propyl acetate, isobutyl acetate, ethyl butyrate, butyl acetate, ethyl-2-methylbutyrate, hexyl acetate, and (*Z*)-3-hexenyl acetate จะเพิ่มขึ้นในช่วงที่แตง แคนตาลูปสุกแก่เต็มที่ สามารถตรวจพบปริมาณแอลกอฮอล์ในเนื้อแตงเมลอนในช่วงระยะเริ่มสุกแก่ (40 วันหลังผสมเกสร) จนถึงระยะผลสุกงอม (50 วันหลังผสมเกสร) เท่านั้นที่ โดยพบ ethyl alcohol มากที่สุด รองลงมาคือ methyl alcohol และ butyl alcohol (ตารางที่ 1) สำหรับ ethyl acetate ที่พบมากในแตงเมลอนนั้นอาจจะขึ้นอยู่กับปริมาณ ethyl alcohol ในเนื้อ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าระดับปริมาณเอสเทอร์ในผลแตงเมลอนขึ้นอยู่กับปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งต้นในเนื้อ (Ueda และคณะ, 1992) โดยเอนไซม์ AAT ในเนื้อสารมาใช้ butyl alcohol, hexyl alcohol, ได้ดีกว่า 3-methyl butyl alcohol และ benzyl alcohol ซึ่งพบกิจกรรมในผลอายุ 45 และ 50 หลังการผสมเกสรเท่านั้น (ภาพที่ 1) ส่วนแอลกอฮอล์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์จากผลไม้ต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกันกับลักษณะที่จำเพาะเจาะจง (Yoshioka และ Hashimoto, 1981)

Table 1 Alcohol contents in mesocarp of 'Kuylin' hybrid netted melon during fruit development

Compounds	Alcohols in headspace (μmol.kg^{-1}.h^{-1}) [1/]				
	Day after anthesis (DAA)				
	30	35	40	45	50
Methyl alcohol	nd[3/]	nd	tr[2/]	0.278	0.853
Ethyl alcohol	nd	nd	tr	5.401	9.172
Propyl alcohol	nd	nd	nd	nd	tr
Butyl alcohol	nd	nd	nd	tr	0.135
Pentyl alcohol	nd	nd	nd	nd	nd
Hexyl alcohol	nd	nd	nd	tr	tr
Nonyl alcohol	nd	nd	nd	nd	nd
3-methyl butyl alcohol	nd	nd	nd	nd	nd
2-ethyl hexyl alcohol	nd	nd	nd	nd	nd
Benzyl alcohol	nd	nd	nd	nd	nd

[1/]Concentrations in μmol.kg^{-1}.h^{-1} calculated with high purity authenticated standard compounds (Sigma-Aldrich)
[2/]tr = trace (<0.01 μmol.kg^{-1}.h^{-1})
[3/]nd = not detected.

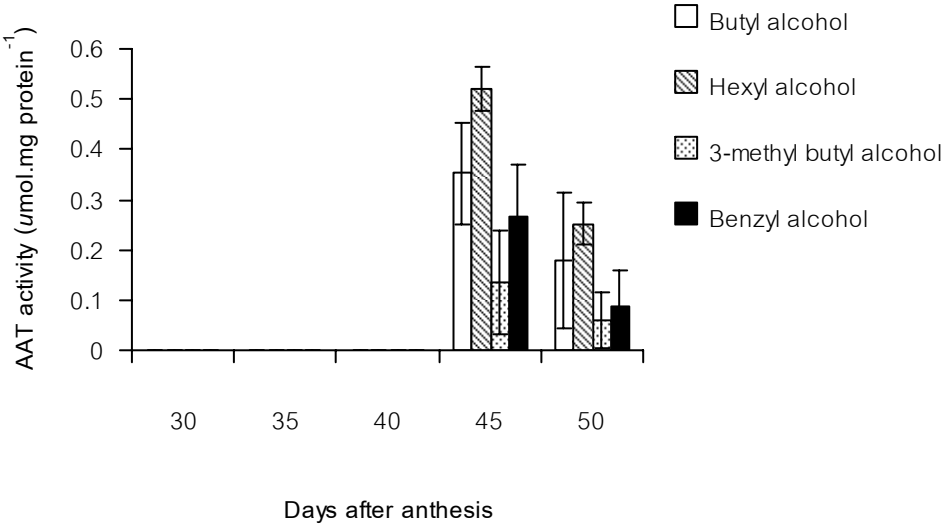

Figure 1 Substrate specificity of AAT activity in mesocarp of 'Kuylin' hybrid netted melon during fruit development. Cell-free extracts were incubated with acetyl-CoA and 0.2 mM of each alcohol as substrates.

สรุปผลการทดลอง

กิจกรรมของเอนไซม์ AAT มีกิจกรรมสูงมากในช่วงปลายของการพัฒนาผล โดยแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นสับเสตรทจากภายนอกและมีความจำเพาะเจาะจงคือ butyl alcohol, hexyl alcohol, 3-methyl butyl alcohol และ benzyl alcohol

เอกสารอ้างอิง

กมล เลิศรัตน์, พิศาล ศิริธร และวีระ ภาคอุทัย. 2535. คู่มือการปลูกแคนตาลูป. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพมหานคร. พิมพ์ครั้งที่ 1. 44 หน้า.

Buttery, R.G., Seifert, R.M., Ling, L.C., Soderstom, E.L., Ogawa, J.M. and Tumbaugh, J.G. 1982. Additional aroma components of honeydew melon. J. Agric. Food Chem. 30: 1208-1211.

Davis, P.L. and Chase, W.G. 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of head space. HortSci. 4: 117-119.

Homatidou, V., Kalvouni, S., Dourtoglou, V. and Poulos, C.N. 1992. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. variety cantaloupensis. J. Agric. Food Chem. 40: 1385-1388.

Perez, A.G., Sanz, C., Olí as, R., Rí os, J.J. and Olí as, J.M. 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. J. Agric. Food Chem. 44: 3286–3290.

Schieberle, P.S. and Grosch, W. 1990. Evaluation of potent odorants in cucumbers (*Cucumis sativus*) and muskmelon (*Cucumis melo*) by aroma extract dilution analysis. J. Food. Sci. 55: 193-195.

Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Schalechet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z. and Lewinsohn, E. 2001. Acetyl-CoA: alcohol acetyl transferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. J. Agric. Food Chem. 49: 794-799.

Ueda, Y. and Ogata, K. 1977. Coenzyme A-dependent esterification of alcohols and acids in separated cells of banana pulp and its homogenate. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 24: 624-630.

Ueda, Y., Tsuda, A., Bai, J.H., Fujishita, N., and Chachin, K. 1992. Characteristic pattern of aroma ester formation from banana, melon, and strawberry with reference to the substrate specificity of ester synthetase and alcohol contents in pulp. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 39: 183–187.

Yabumoto, K. and Jennings, W.G. 1977. Volatile constituents of cantaloupe, *Cucumis melo*, and their biogensis, J. Food Sci. 42: 32-37.

Yamashita, I., Nemoto, Y. and Yoshikawa, S. 1976. Formation of volatile alcohols and esters from aldehydes in strawberries. Phytochem. 15: 1633-1637.

Yoshioka, K. and Hashimoto, N. 1981. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer's yeast. Agric Biol Chem. 45: 2183-2190.