



**BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA
MADURACIÓN DE LA PAPAYA CULTIVADA EN CHILE (*Vasconcellea
pubescens*): ROL DE ETILENO Y PARTICIPACION DE ALCOHOL
ACIL TRANSFERASAS**

**CRISTIÁN ALEJANDRO BALBONTÍN SEPULVEDA
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La papaya cultivada en Chile (*Vasconcellea pubescens*) es un fruto climatérico que desarrolla un aroma intenso, agradable y característico durante la maduración. A fin de lograr una mayor comprensión de este fenómeno, se abordó una estrategia integral que incluyó el estudio de la composición aromática de los frutos, el efecto del etileno sobre la producción de compuestos volátiles, y el aislamiento y caracterización de un gen relacionado con la biosíntesis de aroma. El estudio de la dinámica de producción de compuestos volátiles durante la maduración se llevó a cabo mediante el empleo de fibras de micro extracción en fase sólida (SPME). Los principales compuestos encontrados en el perfil aromático de los frutos corresponden a ésteres (lineales y ramificados) y alcoholes. Los ésteres más abundantes fueron acetato de etilo, butanoato de etilo, butanoato de metilo y acetato de butilo, constituyendo el 88% del total de los volátiles presentes en frutos maduros. Por otra parte, el butanol fue el alcohol más abundante. Los compuestos de mayor poder odorante encontrados en papaya fueron butanoato de etilo, acetato de etilo, hexanoato de etilo y 2-metil butanoato de etilo. Durante la maduración de la papaya se observó un incremento en el contenido total de ésteres y alcoholes. Con el objetivo de clarificar el rol del etileno sobre la producción de aroma en papaya, se trataron frutos al inicio de la maduración con 0,3 $\mu\text{l l}^{-1}$ de 1-MCP (bloqueador de la síntesis de etileno) o con 2 g l^{-1} de Ethrel (etileno exógeno), dejándolos luego desarrollar madurez durante 14 días a 20°C. El tratamiento con 1-MCP inhibió el alza en la producción de esta hormona, en tanto que la aplicación exógena de etileno adelantó el desarrollo de la fase climatérica. La mayoría de los ésteres identificados en papaya mostraron ser dependientes de etileno, incrementando su producción durante el transcurso de la maduración y en respuesta a Ethrel, y siendo fuertemente inhibidos por la aplicación de 1- MCP. Los resultados expuestos permiten concluir que la mayor

parte de los ésteres producidos en papaya provienen del metabolismo de ácidos grasos, y en menor proporción de la vía de degradación de aminoácidos, siendo ambos afectados por etileno. De manera de investigar y esclarecer el rol de las enzimas directamente involucradas en la generación de ésteres con implicancia en el aroma de esta especie, se aisló una secuencia de 1383 pb desde cDNA de frutos maduros de papaya, la cual mostró una alta homología con genes de alcohol acil transferasas (AATs) encontradas en especies frutales y florales. La secuencia, denominada Vp-AAT1, codifica para una proteína de 461 aminoácidos, con una masa molecular cercana a 52 kDa. Ella presenta además los motivos HxxxD y DFGWG, necesarios para la funcionalidad de esta enzima y altamente conservados entre los miembros de la familia BAHD. De acuerdo al análisis de los niveles de transcripción, Vp-AAT1 se expresa exclusivamente en frutos maduros, no detectándose transcritos en raíces, tallos, hojas, flores o frutos en desarrollo. La expresión de Vp-AAT1 aumentó conforme avanza la maduración de los frutos control, observándose similar respuesta luego de la aplicación de etileno exógeno; en tanto que en frutos tratados con 1-MCP, se observó una fuerte disminución en la transcripción del gen, sugiriendo que la expresión de Vp-AAT1 es regulada por etileno. De forma de confirmar la participación de la secuencia previamente aislada en la síntesis de ésteres en papaya, ésta fue expresada en *Saccharomyces cerevisiae*. Los ensayos de actividad utilizando la proteína purificada muestran que Vp-AAT1 es capaz de producir un rango amplio de ésteres volátiles, incluyendo aquellos identificados como los de mayor poder odorante en papaya (butanoato de etilo, hexanoato de etilo y hexanoato de metilo) y otros como acetato de bencilo, acetato de geranilo y acetato de cinamilo, los cuales no se encuentran en el perfil aromático de los frutos. Todas estas evidencias confirman la hipótesis de la participación de enzimas alcohol acil transferasas en la síntesis de compuestos volátiles en frutos de papaya.

ABSTRACT

Mountain or highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) is a climacteric fruit which develops a strong and characteristic aroma during ripening. In order to increase our understanding of this phenomenon, an integral strategy was used. This included the study of the volatile composition of the fruit, the effect of ethylene on the production of volatile compounds, and the isolation and characterization of genes involved in aroma biosynthesis. The dynamics of aroma volatile production during ripening of whole papaya fruit was analysed by headspace-SPME (Solid phase microextraction). The main compounds produced by the fruit were esters (aliphatic and branched) and alcohols. The most abundant esters were ethyl acetate, ethyl butanoate, methyl butanoate and butyl acetate, comprising 88% of the volatiles in fully ripe fruit; butanol was the most abundant alcohol. Among the volatiles produced, ethyl butanoate, ethyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl 2-methylbutanoate were found to be the most potent odour compounds. During ripening of mountain papaya fruit there was an increase in the total content of both esters and alcohols. In order to clarify the role of ethylene in aroma formation, mature fruit were treated with 0.3 $\mu\text{l l}^{-1}$ of 1-MCP (16 h at 20°C) or with 2 g l^{-1} Ethrel, and then allowed to ripen at 20°C. The treatment of the fruit with 1-MCP inhibited the rise of ethylene production in the fruit, while Ethrel advanced the development of the climacteric phase. Most esters identified in mountain papaya were dependent on ethylene, showing an increase in production during ripening and in response to Ethrel treatment, and a strong reduction in response to 1-MCP treatment. The data presented provide evidence that most esters produced by mountain papaya are derived from fatty acids and amino acid metabolic pathways, both of them being affected by ethylene. With the aim to investigate and clarify the role of enzymes directly involved in the production of esters in this specie, a sequence of 1383 pb was isolated from ripe papaya fruits, which showed a high homology with genes codifying to alcohol acyl transferases (AATs) found in fruit and floral species. The sequence denominated Vp- AAT1, codifies a protein of 461 amino acids, with a molecular mass of 52 kDa. It displays the motifs HxxxD and DFGWG, necessary for the functionality of this enzyme which and highly conserved among the members of the BAHD family. According to the transcription analysis, Vp-AAT1 is XVI expressed exclusively in ripe fruits, with

no transcript detection in roots, shoots, leaves, flowers or in developing fruits. Vp-AAT1 expression increased during the development of ripening in control

fruits, and a similar response was observed in response to ethylene treatment, while a strong decrease in the transcription was observed in 1-MCP treated fruits. This suggests that the expression of Vp-AAT1 is regulated by ethylene. In order to confirm the participation of the isolated sequence in the synthesis of esters in papaya, it was expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymatic assays with the purified protein showed that Vp-AAT1 is able to produce a diverse range of esters, including those identified as the most potent odorants in papaya (ethyl butanoate and ethyl hexanoate and methyl hexanoate), and also other esters such as benzyl acetate, geranyl acetate and cinnamyl acetate, which are not included within the aromatic profile of the fruit. All these evidences confirm the hypothesis of the participation of alcohol acyl transferases in the synthesis of volatile compounds in papaya fruit.