



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Relación entre estructura y enzimas de la pared celular en  
caqui sometido a diferentes temperaturas de conservación

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Pantoja Lavado, Sandra

Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Cotutor/a: Llorca Martínez, M<sup>a</sup> Empar

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

**TÍTULO:** Relación entre estructura y enzimas de la pared celular en caqui sometido a diferentes temperaturas de conservación

**RESUMEN:** La conservación en frío del caqui ‘Rojo Brillante’ es una práctica habitual postcosecha para alargar su vida comercial, ya que, su producción se concentra entre los meses de octubre y diciembre. Sin embargo, esta variedad de caqui presenta sensibilidad a las bajas temperaturas, por lo que, la conservación en frío puede ocasionar alteraciones fisiológicas graves denominadas ‘daños por frío’ (DF). En el caqui, los DF producen alteraciones en la firmeza de la pulpa. El tratamiento postcosecha, previo al almacenamiento, con 1-metilciclopropeno (1-MCP) ha mostrado un efecto muy positivo en la reducción de la pérdida de firmeza, por ello, está siendo utilizado en la industria de las frutas. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto que tiene un tratamiento con 1-MCP, previo al almacenamiento en frío a diferentes temperaturas (0°, 1° y 5°C) durante 90 días del caqui sobre las propiedades estructurales de la pulpa y relacionarlas con la actividad de las principales enzimas de la pared celular, concretamente, con la pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG). Para ello, se determinará la firmeza de la pulpa del caqui mediante un texturómetro, se examinará su microestructura mediante el uso de microscopía láser confocal de barrido (CLSM), microscopía electrónica de barrido a temperaturas criogénicas (CRYO-FESEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). También, se determinará la actividad de las enzimas de pared PME y PG que juegan un papel clave en el ablandamiento y pérdida de firmeza de la fruta.

En general, el almacenamiento durante 90 días a 0°C, permite obtener fruta con valores de firmeza elevados y un tejido estructurado. Las muestras de caqui almacenadas a 0°C y tratadas con 1-MCP obtuvieron los valores más elevados de firmeza y mostraron un tejido totalmente estructurado e íntegro. Además, el tratamiento con 1-MCP previo al almacenamiento en frío produjo disminución de las actividades enzimáticas de la PME en muestras almacenadas durante 90 días a 1°C y de la PG en muestras almacenadas a 0 y 1°C. El tratamiento previo con 1-MCP parece ser una herramienta muy útil para mantener la calidad de la fruta durante la conservación en frío.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS-3, Salud y bienestar y ODS-9 Industria, Innovación e Infraestructuras.

**PALABRAS CLAVE:** microestructura; actividad enzimática; PME; PG; firmeza; 1-MCP; vida útil

**TITLE:** Relationship between structure and enzymes of the cell wall in persimmon subjected to different storage temperatures

**ABSTRACT:** The cold storage of the 'Rojo Brillante' persimmon is a common post-harvest practice to extend its commercial life since its production is concentrated between the months of October and December. However, this variety of persimmon is sensitive to low temperatures, so cold storage can cause serious physiological changes called 'cold injury' (CI). In the persimmon, the CI produces alterations in the firmness of the pulp. Postharvest treatment, prior to storage, with 1-methylcyclopropene (1-MCP) has shown a very positive effect in reducing the loss of firmness, therefore, it is being used in the fruit industry. The objective of this work is to analyze the effect of a treatment with 1-MCP, prior to cold storage at different temperatures (0°, 1° and 5°C) for 90 days of the persimmon on the structural properties of the pulp and relate them to the activity of the main enzymes of the cell wall, specifically, with pectinmethylesterase (PME) and polygalacturonase (PG). To do this, the firmness of the persimmon pulp will be determined using a texturometer, its microstructure will be examined using confocal scanning laser microscopy (CLSM), scanning electron microscopy at cryogenic temperatures (CRYO-FESEM) and transmission electron microscopy (TEM). Also, the activity of the PME and PG wall enzymes that play a key role in the softening and loss of firmness of the fruit will be determined.

In general, storage for 90 days at 0°C allows obtaining fruit with high firmness values and a structured tissue. The persimmon samples stored at 0°C and treated with 1-MCP obtained the highest values of firmness and showed a totally structured and intact tissue. In addition, treatment with 1-MCP prior to cold storage produced a decrease in PME enzymatic activities in samples stored for 90 days at 1°C and PG in samples stored at 0 and 1°C. Pretreatment with 1-MCP seems to be a very useful tool to maintain fruit quality during cold storage.

This work is related to the following SDGs of the 2030 Agenda: SDG-3, Health and well-being and SDG-9 Industry, Innovation and Infrastructures.

**KEYWORDS:** microstructure; enzymatic activity; PME; PG; firmness; 1-MCP; useful life

**TÍTOL:** Relació entre estructura i enzims de la paret cel·lular en caqui sotmès a diferents temperatures de conservació

**RESUM:** La conservació en fred del caqui 'Rojo Brillante' és una pràctica habitual postcollita per allargar la seva vida comercial, ja que la seva producció es concentra entre els mesos d'octubre i desembre. Tot i això, aquesta varietat de caqui presenta sensibilitat a les baixes temperatures, per la qual cosa, la conservació en fred pot ocasionar alteracions fisiològiques greus denominades “danys per fred” (DF). Al caqui, els DF produeixen alteracions en la fermesa de la polpa. El tractament postcollita, previ a l'emmagatzematge, amb 1-metilciclopropè (1-MCP) ha mostrat un efecte molt positiu en la reducció de la pèrdua de fermesa, per això està sent utilitzat en la indústria de les fruites. L'objectiu d'aquest treball és analitzar l'efecte que té un tractament amb 1-MCP, previ a l'emmagatzematge en fred a diferents temperatures (0°, 1° i 5°C) durant 90 dies del caqui sobre les propietats estructurals de la polpa i relacionar-les amb l'activitat dels principals enzims de la paret cel·lular concretament amb la pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG). Per això, es determinarà la fermesa de la polpa del caqui mitjançant un texturòmetre, se n'examinarà la microestructura mitjançant l'ús de microscòpia làser confocal d'escombratge (CLSM), microscòpia electrònica d'escombratge a temperatures criogèniques (CRYO-FESEM) i microscòpia electrònica de transmissió (TEM). També es determinarà l'activitat dels enzims de paret PME i PG que juguen un paper clau en l'estovament i la pèrdua de fermesa de la fruita.

En general, l'emmagatzematge durant 90 dies a 0°C permet obtenir fruita amb valors de fermesa elevats i un teixit estructurat. Les mostres de caqui emmagatzemades a 0°C i tractades amb 1-MCP van obtenir els valors més elevats de fermesa i van mostrar un teixit totalment estructurat i íntegre. A més, el tractament amb 1-MCP previ a l'emmagatzematge en fred va produir una disminució de les activitats enzimàtiques de la PME en mostres emmagatzemades durant 90 dies a 1°C i de la PG en mostres emmagatzemades a 0 i 1°C. El tractament previ amb 1-MCP sembla una eina molt útil per mantenir la qualitat de la fruita durant la conservació en fred.

Aquest treball es relaciona amb els ODS següents de l'Agenda 2030: ODS-3, Salut i benestar i ODS-9 Indústria, Innovació i Infraestructures.

**PARAULES CLAU:** microestructura; activitat enzimàtica; PME; PG; fermesa; 1-MCP; vida útil

Autor/a: Pantoja Lavado, Sandra

Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Cotutor/a: Llorca Martínez, M<sup>a</sup> Empar

Valencia, julio de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi agradecimiento a aquellos que han sido parte fundamental en la realización de este trabajo.

A mis tutoras, la Dra. Amparo Quiles y la Dra. Empar Llorca, por su ayuda ante cualquier duda o problema, por sus palabras de ánimo y su positivismo.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Evelina. Les agradezco su colaboración y trabajo en equipo. Cada risa compartida ha hecho de este, un camino más ameno.

A mis padres y a mi hermana, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional y animándome a perseguir mis sueños académicos. Su paciencia y comprensión han sido imprescindibles durante este proceso.

.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Origen del caqui.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. El cultivo de caqui en España .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. El cultivo de caqui en la Comunidad Valenciana .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. El caqui ‘Rojo Brillante’ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5. Enzimas de la pared celular .....</b>	<b>4</b>
<b>1.6. Almacenamiento del caqui .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Objetivo general.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Plan de trabajo.....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1. Determinación de la firmeza .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2. Caracterización de la microestructura.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.4. Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa .....</b>	<b>11</b>
<u>3.2.4.1. Obtención del extracto enzimático .....</u>	<u>11</u>
<u>3.2.4.2. Determinación de la actividad enzimática.....</u>	<u>11</u>
<b>3.2.3. Actividad enzimática de la poligalacturonasa.....</b>	<b>12</b>
<u>3.2.3.1. Obtención del extracto enzimático .....</u>	<u>12</u>
<u>3.2.3.2. Determinación de la actividad enzimática.....</u>	<u>12</u>
<b>3.3. Análisis estadístico .....</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>

<b>4.1. Firmeza del caqui.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Microestructura del caqui .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3. Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4. Actividad enzimática de la poligalacturonasa .....</b>	<b>19</b>
<b>5. <i>CONCLUSIONES</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>6. <i>BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>.....</b>	<b>20</b>
<b><i>ANEXOS</i> .....</b>	<b>24</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Frutos de caqui 'Rojo Brillante' en el árbol.....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Dimensiones y forma de frutos de caqui 'Rojo Brillante' .....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Ejemplo de texturómetro con punzón.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la firmeza (N) ejercida sobre las muestras de caqui estudiadas.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5. Imágenes del caqui sometido a diferentes temperaturas de conservación (0, 1 y 5°C) durante un periodo de 90 días. CLSM: A: 0°C, D:1°C, G:5°C; Cryo-FESEM: B: 0°C, E:1°C, H:5°C; TEM: C: 0°C, F:1°C, I:5°C.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6. Imágenes de las muestras de caqui tratados con I-MCP y sometida a diferentes temperaturas de conservación (0, 1 y 5°C) durante un periodo de 90 días. CLSM: A: 0°C, D:1°C, G:5°C; Cryo-FESEM: B: 0°C, E:1°C, H:5°C; TEM: C: 0°C, F:1°C, I:5°C.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la actividad enzimática de PME (<math>U g^{-1} FW</math>) en muestras de caqui con un periodo de almacenamiento de 90 días.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la actividad enzimática de PG (<math>U g^{-1} FW</math>) en muestras de caqui con un periodo de almacenamiento de 90 días.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura Suplementaria 1 (FS1). Representación gráfica de la recta de calibrado de la concentración de ácido galacturónico frente al incremento de absorbancia.....</i>	<i>25</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Evolución de la producción mundial de caqui del año 2000 al año 2021. Fuente: FAOSTAT.....</i>	<i>1</i>
<i>Tabla 2. Muestras de caqui estudiadas.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabla Suplementaria 1 (TS1). Grado de relación del TFG con los objetivos de desarrollo sostenible ODS) de la Agenda 2030.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla Suplementaria 2 (TS2). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la fuerza ejercida sobre muestras de caqui con los factores temperatura y tratamiento .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla Suplementaria 3 (TS3). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la actividad enzimática de la PME con los factores temperatura y tratamiento .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla Suplementaria 4 (TS4). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la actividad enzimática de la PG con los factores temperatura y tratamiento.....</i>	<i>26</i>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Origen del caqui

El caqui (*Diospyros kaki* L.) es un árbol frutal perteneciente a la familia *Ebanaceae* y al género *Diospyros*. Este género tiene su origen en China y su cultivo comenzó allí algunos siglos antes de Cristo. Más tarde, se introdujo en Japón en el siglo VII y en Corea en el siglo XIV d.C. (Llácer y Badenes, 2002).

El cultivo del caqui fue introducido en Europa, Brasil y Estados Unidos en el s. XIX d.C. como consecuencia del flujo migratorio de Asia. Así pues, en España su cultivo comenzó en esta época como árboles aislados que se mezclaban con otros frutales en los jardines, huertos familiares o pequeñas plantaciones dedicadas al consumo local (Llácer y Badenes, 2003).

En la actualidad, la producción mundial de caqui se estima en 3,5 millones de toneladas, aproximadamente, cultivadas en 1.032.183 ha. De ellas, China es, con mucha diferencia, el primer productor mundial, ya que, representa el 77,5% de la producción total. No obstante, según los datos más recientes, España se sitúa en segundo lugar a causa del extraordinario crecimiento de este cultivo en los últimos años (Tabla 1) (FAOSTAT, 2023).

**Tabla 1.** Evolución de la producción mundial de caqui del año 2000 al año 2021. Fuente: FAOSTAT

Países	Año 2000 (t)	Año 2021 (t)	Variación porcentual
China	1.615.791	3.429.438	112,25
República de Corea	287.847	200.610	-30,31
Japón	278.800	187.900	-32,60
Azerbaiyán	70.266	192.474	173,92
Brasil	63.300	170.242	168,94
Italia	42.450	49.675*	17,02
España	33.000	404.131*	1124,64
Taiwán	23.891	72.662	204,14
Uzbekistán	16.000	83.600	422,5
Israel	14.206	30.000	111,18
Total	2.430.443	4.332.166	78,25

(\*) Estos datos corresponden a 2017, ya que posteriormente se incluyeron en la categoría “otros cultivos”

## 1.2. El cultivo de caqui en España

El caqui comenzó a ser cultivado en España como árbol ornamental, hasta que, posteriormente, debido al sabor agradable de su fruto se cultivó como árbol frutal con fines comerciales.

En los últimos años, España ha experimentado una rápida expansión del cultivo del caqui que se ha establecido, principalmente, en las regiones de clima templado como Cataluña, Andalucía y la Comunidad Valenciana, siendo esta última la mayor productora con un 88% de la producción nacional. (Fernández-Zamudio & Malagón, 2019)

La primera expansión importante del cultivo tuvo lugar en Andalucía, al principio de la década de los 90, cuando varias empresas empezaron a extender el cultivo intensivo de la variedad ‘Triumph’ (principal cultivar en Israel) que se comercializaba tras eliminar la astringencia del fruto con el nombre de ‘Sharon’ o ‘Sharoni’. Al mismo tiempo, tuvo lugar otra gran expansión muy relevante en la provincia de Valencia; en la comarca de la Ribera del Xúquer apareció la variedad ‘Rojo Brillante’. Esta variedad ha supuesto una auténtica revolución en el cultivo del caqui a nivel nacional llegando a ser la variedad más cultivada en el país, con el 90% de la producción total (Llácer y Badenes, 2002).

## 1.3. El cultivo de caqui en la Comunidad Valenciana

En la Comunidad Valenciana, se cultiva, mayoritariamente, la variedad de caqui ‘Rojo Brillante’. Esta variedad surgió debido a una mutación espontánea del cultivar ‘Cristalino’ después de producirse la siembra de semillas en el margen de una parcela del término municipal de Carlet (Badenes et al., 2002).



*Figura 1. Frutos de caqui ‘Rojo Brillante’ en el árbol*

Como consecuencia de la gran expansión del caqui en la Comunidad Valenciana y, concretamente, en la comarca “La Ribera del Xúquer”, donde se sitúa el 63,78% de su producción, en 1997 se creó el Consejo Regulador de la Denominación de Origen con el objetivo de garantizar la procedencia y la calidad del caqui ‘Rojo Brillante’ producido en la zona. En el año 2022, la

producción de caqui en la Comunidad Valenciana supuso una superficie de 14.639 ha (MAPA, 2023).

#### 1.4. El caqui ‘Rojo Brillante’

En cuanto a la terminología botánica, el fruto del caqui es una baya que deriva de la transformación del ovario y de sus ocho carpelos y óvulos. El fruto está compuesto por un epicarpio (cutícula y epidermis), mesocarpio (parte comestible) de consistencia carnosa, endocarpio (parte más cercana a las semillas) y semillas obtenidas por la fecundación de los óvulos.

Las dimensiones y el peso de los caquis varían entre 50-500 g en función de la variedad, las condiciones agroclimáticas y la edad del árbol. En concreto, la variedad ‘Rojo Brillante’ presenta un peso medio de 296,74 g, un calibre medio de 82,49 mm y una relación longitud / anchura de 0,93. En la madurez comercial, el color de la piel de la variedad ‘Rojo Brillante’ es naranja, mientras que la pulpa es amarilla (Perucho, 2019).



*Figura 2. Dimensiones y forma de frutos de caqui ‘Rojo Brillante’*

Los frutos de caqui pueden ser no astringentes y astringentes. Los primeros son aquellos que pueden ser consumidos inmediatamente tras la recolección; mientras que los segundos deben ser sometidos a procesos de sobre maduración o eliminación de la astringencia antes de ser consumidos (Besada, 2008). La variedad ‘Rojo Brillante’ es de tipo astringente, lo que implica la necesidad de eliminar la astringencia en postcosecha. Tradicionalmente, se realizaba con la sobre maduración de los frutos, lo cual provocaba una pérdida de firmeza de la pulpa, que adquiriría una consistencia gelatinosa y dificultaba la manipulación de los frutos para su exportación. Por ello, se desarrolló una nueva técnica de eliminación de la astringencia con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> que logra una consistencia firme del fruto con una pulpa crujiente y color anaranjado (Perucho, 2019).

## 1.5. Enzimas de la pared celular

La pared de la célula vegetal es una estructura compleja compuesta principalmente por hidratos de carbono, concretamente, celulosa, hemicelulosas y pectinas, proteínas y lípidos. Cada uno de estos componentes juega un papel vital en la función y protección de la célula. Las proteínas y los lípidos son componentes minoritarios. Las proteínas están, principalmente, involucradas en el transporte de solutos y en la comunicación intercelular, aunque también existen proteínas estructurales que refuerzan la pared y contribuyen a su integridad. Los lípidos están presentes en menor cantidad y contribuyen a la impermeabilidad de la pared celular, evitando la pérdida excesiva de agua y protegiendo a la célula de daños externos (Caffall y Mohnen, 2009).

La celulosa es el componente principal y más abundante de la pared celular. Es un polímero de glucosa formado por largas cadenas lineales que se organizan en fibrillas. Estas fibrillas confieren resistencia y rigidez a la pared celular, dándole su estructura sólida. La celulosa también es resistente a la degradación enzimática, lo que contribuye a la protección de la célula (Jarvis, 2011).

Las hemicelulosas son polímeros más ramificados y menos rígidos, por lo que aportan flexibilidad y ayudan a unir las fibrillas de celulosa, contribuyendo así a la cohesión de la estructura (Jarvis, 2009).

Las pectinas o polisacáridos pécticos son polisacáridos gelatinosos ricos en ácido galacturónico unido covalentemente mediante enlaces alfa-(1→4) que pueden estar metilesterificados en el carboxilo del carbono C-6 (de Vries y Visser, 2001; Ridley et al., 2001). Por ello, las pectinas se pueden clasificar en función de su grado de metilesterificación, como pectinas de alto metoxilo (grado de metilesterificación > 50%) y pectinas de bajo metoxilo (grado de metilesterificación <50%) (Rinaudo, 1996). Se encuentran en la región intercelular de la pared celular y, junto con las hemicelulosas, son componentes fundamentales de la lámina media. Son responsables de mantener unidas las células vecinas y actúan como una especie de pegamento. Además, las pectinas juegan un papel importante en la retención de agua, lo que contribuye a mantener la turgencia de la célula. Al formar una red en la pared celular, pueden restringir o permitir el paso de diferentes sustancias, lo que es fundamental para el intercambio de nutrientes, agua y otros metabolitos entre las células. Durante el desarrollo de los tejidos vegetales, las pectinas se modifican para adaptarse a las necesidades específicas de cada tejido en crecimiento, por ejemplo, al modificarse permiten que la fruta se vuelva más blanda y comestible a medida que madura (Mohnen, 2008). Durante la maduración, el almacenamiento y el procesado del caqui, la pared celular puede sufrir cambios asociados a la disolución de la lámina media y a la desorganización de la pared celular primaria que afectan a la funcionalidad de los frutos (Goulao y Oliveira, 2008). Estos cambios comprenden procesos de solubilización, desesterificación y despolimerización

producidos en los polisacáridos pécticos tanto por conversiones enzimáticas como por no enzimáticas (Sila et al., 2008).

Durante la maduración, el almacenamiento y el procesado del caqui, la pared celular puede sufrir cambios asociados a la disolución de la lámina media y a la desorganización de la pared celular primaria que afectan a la funcionalidad de los frutos (Goulao y Oliveira, 2008). Estos cambios comprenden procesos de solubilización, desesterificación y despolimerización producidos en los polisacáridos pécticos tanto por conversiones enzimáticas como por no enzimáticas (Sila et al., 2008)

Las pectinas son sustrato de diferentes enzimas. La enzima pectinmetilesterasa (PME) cataliza la desesterificación de las mismas, mientras que la enzima poligalacturonasa (PG) cataliza la despolimerización (Huber et al., 2001). Ambas enzimas son extremadamente activas en el tejido en respuesta a la maduración y degradación del tejido. Por lo tanto, las enzimas PME y PG presentan gran relación con los cambios de textura (ablandamiento y pérdida de firmeza) del fruto (Sila et al., 2008).

### **Pectinmetilesterasa**

La enzima pectinmetilesterasa (PME) juega un papel crucial en la modificación de las pectinas presentes en las paredes celulares de las plantas. Se localiza principalmente en la lámina media de las células vegetales. La PME cataliza la desmetoxilación de las pectinas, es decir, desesterifica los polisacáridos pécticos. Al eliminar los grupos metilo de las pectinas, convierte las pectinas metiladas en pectinas desmetiladas (Jolie et al., 2010). Este proceso es esencial para la regulación de la rigidez de la pared celular, ya que las pectinas desmetiladas son más susceptibles a la acción de otras enzimas que pueden romper los enlaces de las pectinas y, así, permitir el ablandamiento de la pared celular durante el crecimiento de las células vegetales o el proceso de maduración de los frutos (Micheli, 2001).

### **Poligalacturonasa**

La poligalacturonasa (PG) es una enzima de la pared celular que rompe el enlace glicosídico  $\alpha$  (1-4) que une dos residuos de ácido galacturónico de pectinas poco metilesterificadas. Esta enzima puede clasificarse como endo o exo. Cuando se encuentra en el interior del polímero se llama endo-PG, hidroliza la pectina de manera aleatoria y produce una rápida disminución de la viscosidad. En cambio, cuando se encuentra en los extremos del polímero se llama exo-PG y produce moléculas libres de ácido poligalacturónico (Whitaker et al., 2003).

## 1.6. Almacenamiento del caqui

La maduración del caqui 'Rojo Brillante' tiene lugar entre mediados de octubre y finales de noviembre, por esta razón, el caqui es un fruto estacionario. La alta producción y el corto periodo comercial hacen necesario introducir nuevas técnicas postcosecha que permitan alargar su periodo de vida comercial para abastecer el mercado de fruta fresca de alta calidad durante más tiempo.

Una de las principales técnicas postcosecha que se utilizan para alargar el periodo de vida comercial del caqui es la conservación en frío durante el almacenamiento. Gracias a ella se ralentiza su actividad bioquímica, se reduce el crecimiento y propagación de microorganismos y disminuye la pérdida de humedad del fruto. Sin embargo, el uso de temperaturas inadecuadas para conservar la fruta puede ocasionar alteraciones fisiológicas graves denominadas 'daños por frío' (DF) (Salvador et al., 2020).

Los síntomas de DF desarrollados en el caqui varían entre los cultivares, pero en general, en la mayoría de los casos está relacionado con alteraciones en la firmeza de la pulpa, con un drástico ablandamiento de la pulpa o gelificación de la misma (Besada et al., 2014; Salvador et al., 2005).

Normalmente, mientras el fruto permanece a bajas temperaturas el daño no se hace visible manteniendo la firmeza de recolección, sin embargo, cuando el fruto es transferido a temperaturas de comercialización tiene lugar una importante pérdida de firmeza. En el caqui los daños por frío se relacionan con cambios estructurales en la pulpa como el ablandamiento ó pérdida de firmeza, gelificación, gomosidad y aparición de nódulos e incluso un manchado interno de la pulpa. A su vez, todos estos defectos se pueden ver agravados en presencia de etileno en la atmósfera (Salvador et al., 2020).

Se han realizado muchos estudios con el objetivo de encontrar soluciones postcosecha para prevenir o disminuir los daños por frío. Ente ellos, se han evaluado tratamientos térmicos previos al almacenamiento (agua/aire caliente), almacenamiento en atmósferas controladas y modificadas y tratamientos químicos exógenos (1-metilciclopropeno) anteriores al almacenamiento (Besada, 2008).

El tratamiento postcosecha, previo al almacenamiento, de distintos cultivares de caqui con 1-metilciclopropeno (1-MCP) ha mostrado un efecto muy positivo en la reducción de la pérdida de firmeza, por ello, está siendo utilizado en la industria. El 1-MCP es un potente inhibidor de la acción del etileno que actúa uniéndose al receptor del etileno en la membrana celular, bloqueando así su acción (Sisler & Serek, 1997). La inhibición del etileno puede provocar la inhibición de las enzimas de la pared celular, poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (PME) y, por lo tanto, retrasar el reblandecimiento del caqui (Luo, 2007).



Sin embargo, la conservación en frío durante el almacenamiento, incluso en frutos tratados con 1-MCP, provoca una textura gomosa en el fruto. Como consecuencia, la pulpa deja de ser crujiente y pasa a ser elástica y gomosa. Esto supone una gran pérdida de calidad en el caqui y, además, dificulta su desastringencia. (Salvador et al., 2008).

## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es analizar el efecto que tiene el tratamiento previo al almacenamiento con 1-metilciclopropeno y un posterior periodo de almacenamiento de 90 días a diferentes temperaturas de refrigeración (0°, 1° y 5°C) sobre la actividad de las enzimas de pared celular pectinmetilesterasa y poligalacturonasa y sobre las propiedades estructurales del caqui ‘Rojo Brillante’.

### **2.2. Objetivos específicos**

Para conseguir el objetivo general, se plantearon algunos objetivos específicos:

1. Conocer la influencia del tratamiento anterior al almacenamiento con 1-metilciclopropeno y del periodo de 90 días de almacenamiento en frío a diferentes temperaturas (0°, 1° y 5°C) sobre la firmeza del caqui.
2. Conocer la influencia del tratamiento anterior al almacenamiento con 1-metilciclopropeno y del periodo de 90 días de almacenamiento en frío a diferentes temperaturas (0°, 1° y 5°C) sobre la microestructura del caqui.
3. Conocer la influencia del tratamiento anterior al almacenamiento con 1-metilciclopropeno y del periodo de 90 días de almacenamiento en frío a diferentes temperaturas (0°, 1° y 5°C) sobre la actividad enzimática de las enzimas pectinmetilesterasa y poligalacturonasa de la pared celular del caqui.

Este trabajo se encuentra alineado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en concreto con el ODS 3, Salud y Bienestar, gracias a que se persigue que el consumidor disponga de un producto de elevado valor nutricional durante un periodo más extenso que el actual; ODS 9, Industria, Innovación e infraestructuras, porque se persigue optimizar e innovar a nivel industrial el tratamiento postcosecha del caqui (Anexos, Tabla Suplementaria TS1).

## **2.3. Plan de trabajo**

Para alcanzar los objetivos descritos se siguió el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión de estudios previos sobre: caqui ‘Rojo Brillante’, enzimas de la pared celular del caqui, métodos de extracción y determinación de la actividad enzimática de las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (PME), almacenamiento postcosecha del caqui y tratamiento con 1-metilciclopropano (1-MCP).
2. Determinación de la firmeza de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP y a un posterior periodo de almacenamiento en frío durante 90 días a temperaturas de 0, 1 y 5°C.
3. Caracterización de la microestructura de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP y a un posterior periodo de almacenamiento en frío durante 90 días a temperaturas de 0, 1 y 5°C.
4. Obtención de extractos de las enzimas PG y PME a partir de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP y a un posterior periodo de almacenamiento en frío durante 90 días a temperaturas de 0, 1 y 5°C.
5. Determinación de la actividad enzimática de las enzimas PG y PME de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP y a un posterior periodo de almacenamiento en frío durante 90 días a temperaturas de 0, 1 y 5°C.
6. Análisis y discusión de los resultados obtenidos

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Materiales**

Para la realización de este trabajo se estudiaron muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ proporcionadas por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) que habían sido sometidas a un periodo de almacenamiento en frío durante 90 días a temperaturas de 0, 1 y 5°C. La mitad de las muestras almacenadas habían recibido un tratamiento de conservación, previo al almacenamiento en frío, con 1-metilciclopropano (1-MCP) bajo condiciones comerciales (500 nL/L de 1-MCP durante 24 h a 1°C). Transcurrido el periodo de almacenamiento, los frutos fueron sometidos a un tratamiento de desastringencia bajo condiciones comerciales (95 % CO<sub>2</sub> durante 24 h a 20°C y 90 % HR). Se estudiaron 6 muestras de caqui diferentes, dependiendo de la temperatura empleada para el almacenamiento en frío y según si fueron sometidas o no a tratamiento previo al almacenamiento con 1-MCP (Tabla 2).

**Tabla 2.** Muestras de caqui estudiadas

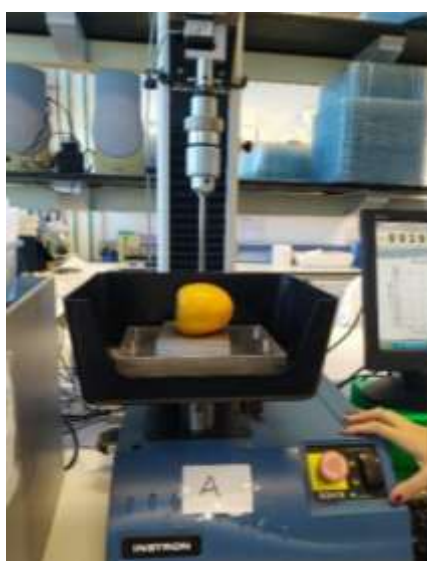
MUESTRA	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO EN FRÍO (°C)	TRATAMIENTO PREVIO AL ALMACENAMIENTO CON 1-MCP
0	0	NO
0-MCP	0	SI
1	1	NO
1-MCP	1	SI
5	5	NO
5-MCP	5	SI

Para obtener los extractos enzimáticos, se tomaron diferentes frutos. Una vez eliminada la piel, la pulpa de los frutos se troceó, se congeló con nitrógeno líquido y se trituró para obtener un puré. Las muestras trituradas se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinación de la firmeza

La firmeza del fruto se evaluó mediante un texturómetro (Instron Corp., mod. 4301, Canton, Mass., U.S.A.), utilizando un punzón de 8 mm de diámetro sobre los frutos, realizándose la determinación en la zona ecuatorial del fruto (Figura 3). Los resultados se expresaron como la fuerza en Newton (N) necesaria para romper la pulpa en la zona ecuatorial, retirándose previamente la piel del fruto en esa zona.



**Figura 3.** Ejemplo de texturómetro con punzón

### 3.2.2. Caracterización de la microestructura

Para caracterizar la orografía de la pulpa de caqui se utilizó un microscopio electrónico de barrido criogénico (Cryo-SEM, ZEISS ULTRA 55, Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido). Para ello, pequeñas porciones de caqui se colocaron sobre el soporte del microscopio, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se transfirieron a una unidad criogénica donde se produce la sublimación durante 15 min a  $-90^{\circ}\text{C}$  (CT 15.000 C; Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido) conectada a un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOLJSM 5410, JEOL, Tokio, Japón). Tras fracturarse y recubrirse con platino a 5 mA durante 30 s, las muestras se observaron a 2 kV y a una distancia de trabajo de 3-5mm.

Para estudiar la estructura de la pared celular de las muestras de caqui por microscopía láser confocal de barrido (CLSM) se empleó un microscopio ZEISS 780 acoplado a un microscopio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Alemania). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua C-Apochromat 40X/1,2 W para visualizar las muestras. Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 1024 x 1024 píxeles utilizando el software del microscopio (ZEN). Para teñir los polisacáridos de la pared celular se utilizó Calcofluor White (Fluka, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos), que se excitó con la línea de diodos 405 y se detectó a 410-477 nm. Además, se observó la autofluorescencia de los carotenoides a 515 nm. Para observar y estudiar las muestras, se obtuvieron secciones de tejido (20 mm de grosor) con un criostato (CM 1950, Leica, Biosystems, Nussloch, Alemania). La porción de tejido se colocó en un portaobjetos, se añadieron 20 mL de Calcofluor White y se dejó reposar durante 5 min. A continuación, se cubrieron las muestras con un cubreobjetos de vidrio.

La ultraestructura de las muestras de caqui se observó con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (HITACHI HT7800 120 kV, Hitachi, Japón). Para ello, las muestras de caqui se cortaron en cubos ( $3\text{ mm}^3$ ), que se fijaron con una disolución de glutaraldehído 25 g/L (tampón fosfato 0,025 M, pH 6,8, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h), se postfijaron con una disolución de tetróxido de osmio 20 g/L (1,5 h), se deshidrataron utilizando una serie de concentración creciente de etanol (300, 500, 700 y 1000 g/kg), se contrastaron con una disolución de acetato de uranilo (20g/L) y, se incluyeron en una resina araldita (Aname, Madrid, España). Los bloques obtenidos se cortaron utilizando un ultramicrotomo Reichert-Jung ULTRACUT (Leica, Microsystems, Wetzlar, Alemania) en secciones ultrafinas (0,1 mm) que se recogieron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo (40g/L) para ser observadas a 100 kV.

### 3.2.4 Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa

#### 3.2.4.1 *Obtención del extracto enzimático*

La obtención del extracto enzimático de pectinmetilesterasa (PME) se realizó según el método descrito por Liu et al. (2023) con modificaciones. Para ello, en tubos de centrifuga se introdujo 1 g de puré de caqui, se añadieron 6 mL de tampón NaCl al 8,8% (p/v) que contenía 10 g/L de polivinilpirrolidona (PVPP) y la mezcla se homogeneizó en el Ultraturax (T25 Digital, IKA-Werke, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1h a 4°C. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y a 4°C, se recogió el sobrenadante (extracto enzimático) y se almacenó en frío. Seguidamente, se añadieron al residuo sólido otros 6 mL del tampón de extracción y se repitió el proceso. Los sobrenadantes recogidos de la primera y segunda centrifugación se juntaron y se ajustó su pH a 7,5 con NaOH 0,1 M y se aforó a un volumen de 10 mL con tampón NaCl al 8,8% (p/v) que contenía 10 g/L de PVPP. Finalmente, el extracto se almacenó en eppendorfs de 2 mL a -80 °C hasta su uso para la determinación de la actividad enzimática de la PME.

#### 3.2.4.2 *Determinación de la actividad enzimática*

Para la determinación de la actividad enzimática de la PME se siguió el protocolo descrito por Zhang et al. (2022). Para ello, en tubos de ensayo se añadieron 1 mL de disolución de pectina al 0,05% ((p/v), pH 7,5), 0,10 mL de disolución de azul de bromotimol al 0,01% ((p/v), disuelta en tampón fosfato 0,3 M, pH 7,5) y 0,75 mL de agua destilada. La mezcla se incubó en un baño de agua a 40°C durante 30 min. A continuación, se añadió 0,1 mL de extracto enzimático y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm a los 10 s y a los 130 s empleando un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Maddison. US).

Por último, para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la EC2.

$$\text{Actividad de PME (U g}^{-1}\text{ FW)} = (A_{10} - A_{130}) \cdot V / W / t \quad (\text{EC2})$$

Donde  $A_{10}$  es la absorbancia medida a los 10 s de reacción;  $A_{130}$  es la absorbancia medida a los 130 s; V es el volumen de tampón de extracción expresado en mL (10 mL), W es el peso de la muestra (1 g) y t es el tiempo de reacción (2 min).

La actividad de PME se expresó como U g<sup>-1</sup> FW. Una unidad de actividad enzimática se definió como un cambio de absorbancia de 0,01/min.

### 3.2.3. Actividad enzimática de la poligalacturonasa

#### 3.2.3.1. Obtención del extracto enzimático

Para obtener los extractos enzimáticos de la poligalacturonasa (PG) se siguió el método descrito por Liu et al. (2023) con algunas modificaciones. Para ello, en tubos de centrífuga se introdujeron 5 g de puré de caqui, se añadieron 20 mL de una disolución de etanol al 96% y la mezcla se homogeneizó en un Ultraturax (T25 Digital, IKA-Werke, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min. Seguidamente, se centrifugó a 10.000 rpm y 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 10 mL de etanol al 80% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, descartando de nuevo el sobrenadante. Este paso se volvió a repetir, añadiendo otros 10 mL de etanol al 80%. Al residuo sólido recuperado se le añadieron 5 mL de tampón de extracción (que contenía 1,8 mol/L de NaCl y 50 mmol/L de tampón de ácido acético-acetato sódico, pH 5,5) y se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y 4°C. Al finalizar, se recogió el sobrenadante (extracto enzimático) en un matraz aforado y se aforó a 10 mL con tampón de extracción. Este extracto se almacenó en eppendorfs de 2 mL a -80°C hasta su uso para la determinación de la actividad enzimática de la PG.

#### 3.2.3.2. Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática de la PG se siguió el método descrito por Liu et al. (2023) con algunas modificaciones. Para ello, en tubos de ensayo se añadieron 0,5 mL de extracto enzimático, 1 mL de tampón acetato sódico (50 mmol/L, pH 5,5) que contenía ácido poligalacturónico al 0,5% (p/v) y 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (44 mmol/L) y para que se llevara a cabo la reacción enzimática, la mezcla se llevó a reacción durante 1 h en un baño de agua a 37°C. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo introduciendo el tubo de ensayo en un baño de agua hirviendo durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se filtró con un filtro de jeringa de Nylon de tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y diámetro de 25 mm. Se realizó un blanco con 0,5 mL de agua destilada. Finalmente, se midió mediante un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Maddison, USA) la absorbancia de las muestras y del blanco a una longitud de onda de 540 nm.

Para calcular la actividad enzimática se utilizó la EC1.

$$\text{Actividad de PG (U g}^{-1}\text{ FW)} = x \cdot V / W / t \quad (\text{EC1})$$

Donde x es la concentración de ácido galacturónico obtenida a partir de la recta de calibrado, expresada en (mmol/mL); V es el volumen de tampón de extracción expresado en mL (10 mL); W es el peso de la muestra en gramos (5 g) y t es el tiempo de reacción en horas (1h).

La actividad de la PG se define como  $U\ g^{-1}\ FW$ . Una unidad de actividad enzimática fue definida como la producción de 1 mM de ácido galacturónico por minuto. El cálculo de la actividad de PG se realizó frente a una curva estándar (Anexos, Figura Suplementaria FS1).

### **3.3 Análisis estadístico**

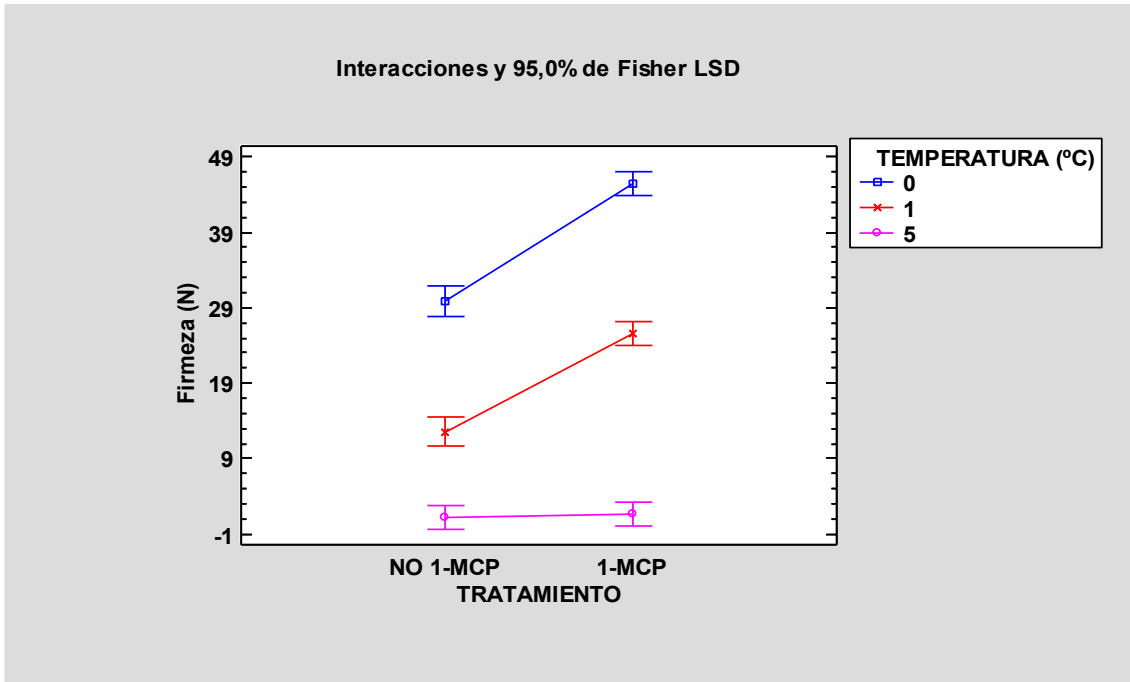
El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statpoint Technologies Inc. USA). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para analizar el efecto del tratamiento con 1-MCP y del posterior periodo de almacenamiento durante 90 días en frío a diferentes temperaturas (0, 1 y 5°C) sobre la firmeza y la actividad enzimática de la PG y PME en muestras de caqui. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se utilizó el método LSD (Least Significant Difference), a un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **4.1. Firmeza del caqui**

Tanto el factor tratamiento con 1-MCP como la temperatura de almacenamiento en frío durante 90 días presentaron efectos significativos sobre la firmeza (fuerza necesaria para romper la pulpa en la zona ecuatorial tras retirarse la piel) y, además, hubo interacciones entre ambos factores para el parámetro firmeza. En Anexos como material suplementario se presenta la tabla con el análisis de la varianza multifactorial (Tabla Suplementaria TS2).

Si se comparan todas las muestras (Figura 4) se puede observar que los valores de firmeza fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevados cuando el almacenamiento en frío se produjo a 0°C, tanto en las muestras tratadas previamente con 1-MCP como en las no tratadas, sin embargo, las tratadas presentaron los valores de firmeza significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores. Las siguientes muestras más firmes fueron las almacenadas a 1°C, siendo las tratadas las que presentaron los valores de firmeza significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores. Las muestras almacenadas a 5°C presentaron los menores valores ( $p < 0,05$ ) de firmeza, independientemente de si se sometieron a un tratamiento previo con 1-MCP o no, sin presentar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas. El tratamiento con 1-MCP, previo al almacenamiento en frío a 0 y 1°C, proporcionó firmeza a las muestras de caqui. Probablemente, estas muestras presenten un tejido más estructurado capaz de resistir las temperaturas de almacenamiento.



**Figura 4.** Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la firmeza (N) ejercida sobre las muestras de caqui estudiadas.

En el estudio realizado por Vilhena et al. (2022) se recolectaron muestras de caqui y se determinó la firmeza de las mismas en el momento de la recolección y tras varios periodos de almacenamiento (30, 60 o 90 días) a 0°C, seguidos de 5 días a 20°C y tratados previamente con 1-MCP. En el momento de la cosecha todos los frutos mostraron valores de firmeza entre 40-48N, siendo 40N el valor mínimo requerido para la conservación de esta variedad. No obstante, tras el tratamiento y el periodo de almacenamiento, se observó que aquellos frutos con recolección más tardía, con el aumento del tiempo de almacenamiento, obtuvieron valores de firmeza menores, alcanzando los 15N.

Las muestras tratadas con 1-MCP y almacenadas a 0°C estudiadas en este trabajo obtuvieron valores de firmeza de  $45,5 \pm 5,3$  N similares a los datos aportados por Vilhena et al., (2022) en las muestras recolectadas. Esto indica que este tratamiento postcosecha parece ser el más adecuado para mantener la firmeza del caqui durante un periodo de almacenamiento de 90 días. Todos los demás tratamientos postcosecha produjeron descensos acusados en los valores de firmeza si se compara con el valor en recolección.



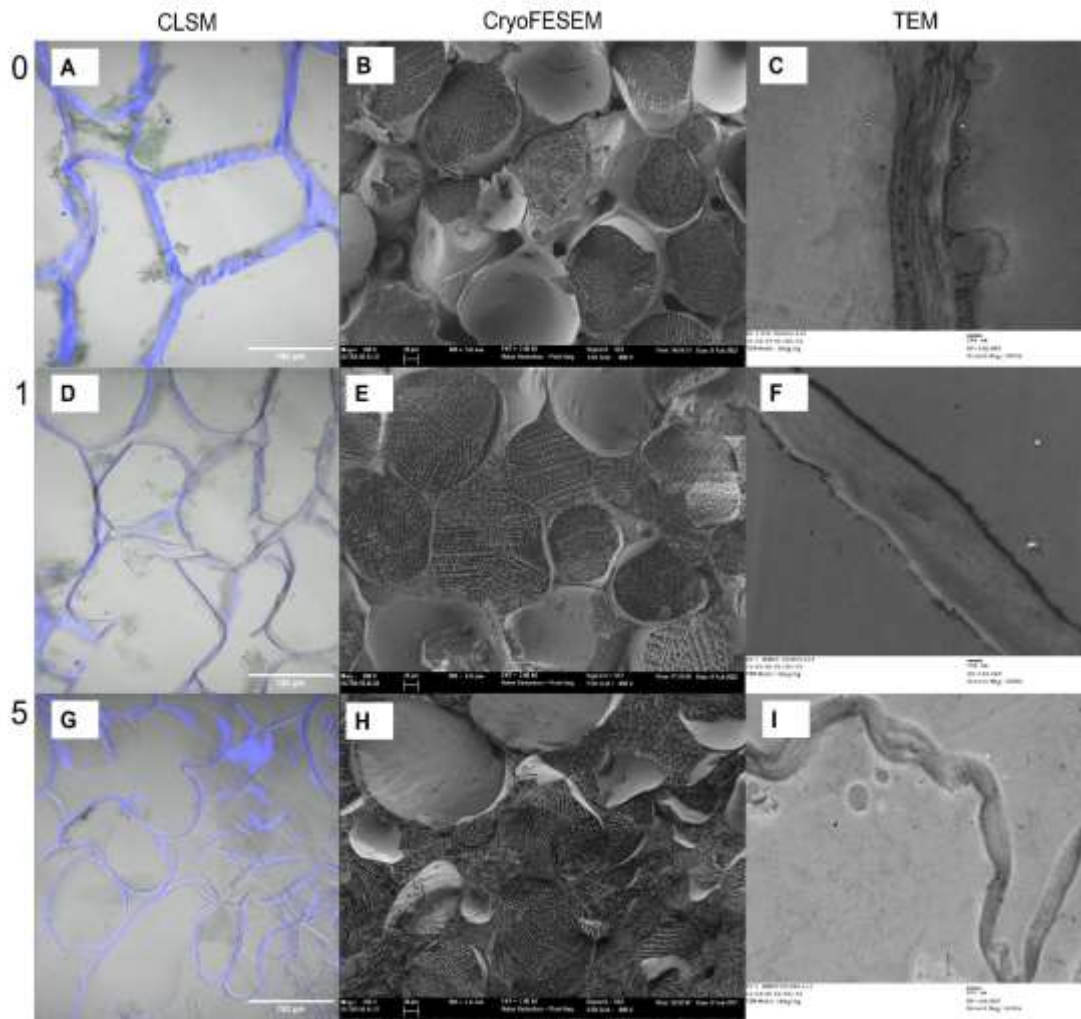
## 4.2. Microestructura del caqui

En la figura 5 se muestran las imágenes del caqui sometido a diferentes temperaturas de conservación, concretamente, 0, 1 y 5°C durante un periodo de 90 días.

El tejido de caqui sometido a 0°C se mostró estructurado e integro (Figura 5 A y B). Los pigmentos carotenoides que presentan autofluorescencia y se pueden observar de color verde en CLSM se localizaron, principalmente, en las proximidades de las paredes celulares (Figura 5A). Las células presentaron un aspecto redondeado, turgente, con espacios intercelulares vacíos, probablemente por ausencia de estrés celular (Figura 5B). Por TEM (Figura 5C) se pudo apreciar un alto grado de empaquetamiento en las paredes celulares y como las membranas celulares (plasmalema y tonoplasto) estaban ubicadas en las proximidades de la pared.

El tejido de caqui almacenado a 1°C se observó menos estructurado que el almacenado a 0°C. Aunque sí se observaron carotenoides en las proximidades de la pared celular (Figura 5D) en algunas zonas aparecieron localizados en el interior de la célula. Las células presentaron un menor grado de turgencia (Figura 5E) con paredes alabeadas. El tejido mostró algunas células vecinas separadas entre sí, espacios intercelulares con presencia de soluto, probablemente, como consecuencia del estrés celular. Las paredes y membranas celulares se observaron más tenuemente teñidas, indicando un cierto grado de disolución de sus componentes estructurales (Figura 5F). Esta muestra presentó un menor grado de firmeza como se puede observar en el apartado anterior.

El almacenamiento a 5°C mostró el tejido de caqui con un alto grado de desestructuración. Las células se observaron deformadas, con pérdida de integridad y salida del contenido celular (Figura 5G y H). Las paredes celulares se observaron disueltas, alabeadas y deformadas y, las membranas celulares degradadas (Figura 5I). Estas muestras fueron las que presentaron menores valores de firmeza.

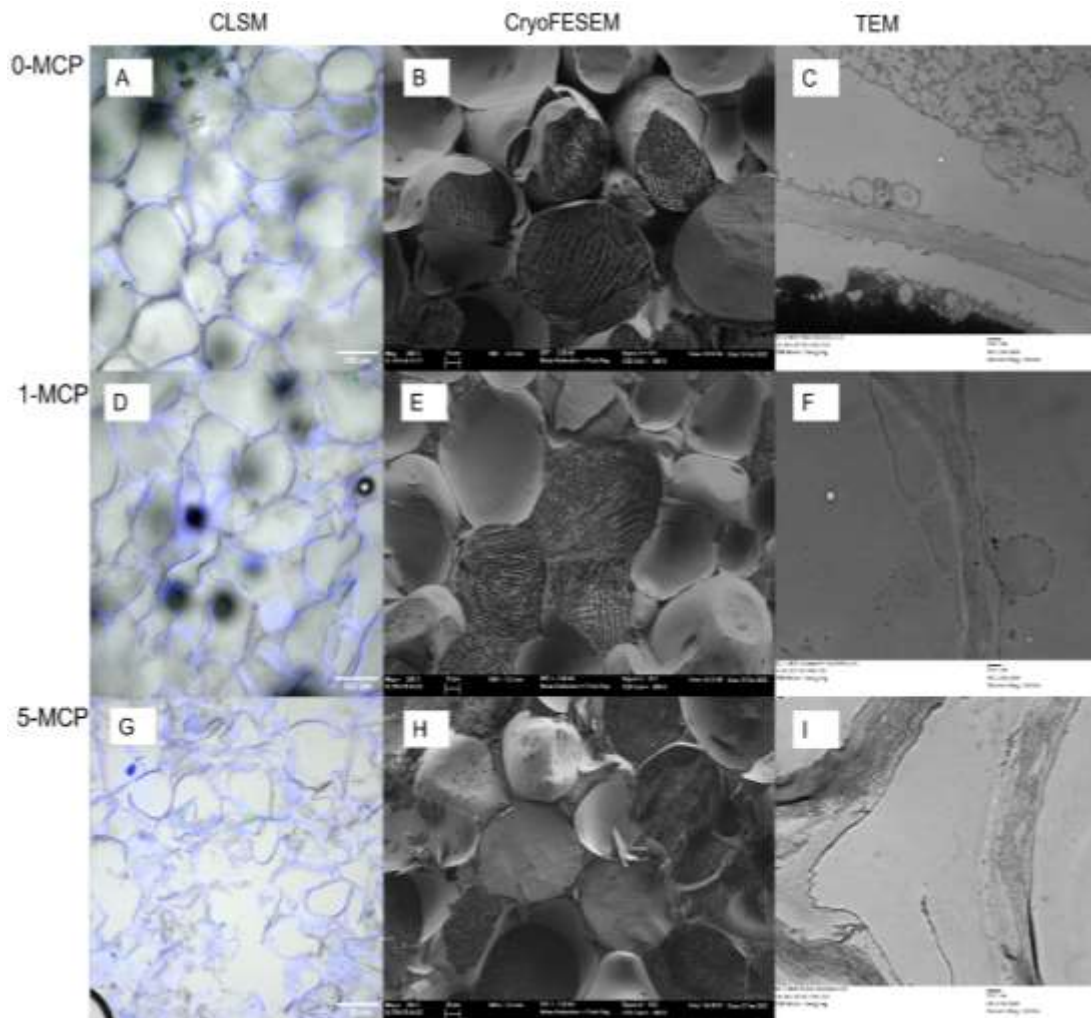


**Figura 5.** Imágenes del caqui sometido a diferentes temperaturas de conservación (0, 1 y 5°C) durante un periodo de 90 días. CLSM: A: 0°C, D:1°C, G:5°C; Cryo-FESEM: B: 0°C, E:1°C, H:5°C; TEM: C: 0°C, F:1°C, I:5°C

En la figura 6 se pueden observar las imágenes de las muestras de caqui almacenadas durante 90 días a diferentes temperaturas de conservación, concretamente, 0, 1 y 5°C y tratadas previamente con 1-MCP.

El tejido de las muestras tratadas con 1-MCP y almacenadas a 0°C (Figura 6 A y B) presentaron un alto grado de estructuración celular. Si se comparan las tratadas con las no tratadas y almacenadas a 0°C ambos tejidos presentan células turgentes y redondeadas con paredes adyacentes cementadas y estructuradas (Figura 6C). El tejido de las muestras tratadas con 1-MCP y almacenadas a 1°C (Figura 6D y E) está menos estructurado que la almacenada a 0°C, sin embargo, si se compara con la no tratada y almacenada a 1°C el tejido se mostró más estructurado que el no tratado, con células más redondeadas y firmes y con paredes que mantienen mayor grado de empaquetamiento fibrilar (Figura 6F). Para la misma temperatura de almacenamiento, el tejido tratado con 1-MCP presentó valores de firmeza mayores que el no tratado, como se ha visto en

los datos de firmeza. A 5°C, el tejido de caqui tratado previamente al almacenamiento con 1-MCP (Figura 6G y H) se observó desestructurado, mostró células poco turgentes, separadas unas de otras y grandes espacios intercelulares generados por la disolución de los componentes celulares (Figura 6I). A 5°C la apariencia estructural de las muestras fue similar independientemente de si la fruta fue tratada o no con 1-MCP. Estas imágenes corroboran los resultados obtenidos en el apartado de firmeza, en el que ambas muestras presentaron valores muy similares en este parámetro.



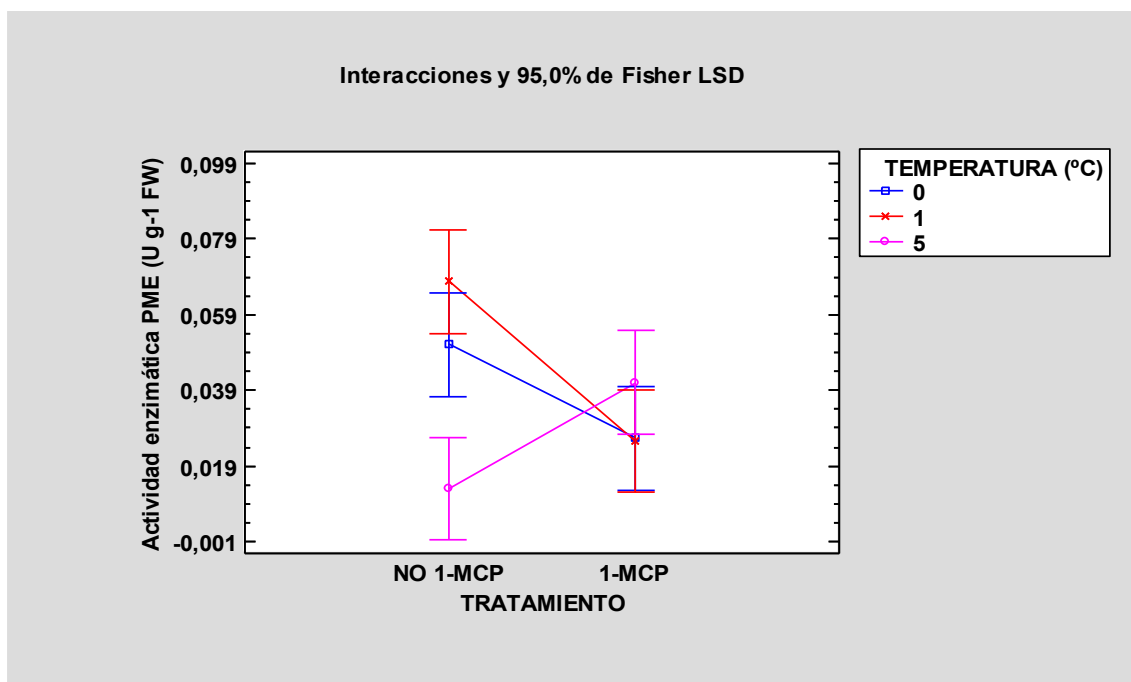
**Figura 6.** Imágenes de las muestras de caqui tratados con 1-MCP y sometida a diferentes temperaturas de conservación (0, 1 y 5°C) durante un periodo de 90 días. CLSM: A: 0°C, D:1°C, G:5°C; Cryo-FESEM: B: 0°C, E:1°C, H:5°C; TEM: C: 0°C, F:1°C, I:5°C

### 4.3. Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa

A partir de los resultados estadísticos (Anexos, Tabla Suplementaria TS3) se pudo comprobar que ni el factor tratamiento con 1-MCP ni el factor temperatura de almacenamiento en frío tuvieron un efecto estadísticamente significativo para el parámetro actividad enzimática de la pectinmetilesterasa (PME). Sin embargo, la interacción entre ambos factores si resultó tener un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre este parámetro.

En la figura 7 se presenta el gráfico de interacciones con los intervalos LSD de las muestras estudiadas. El tratamiento con 1-MCP influyó en la actividad enzimática cuando la temperatura de almacenamiento fue 1 y 5°C. En las muestras almacenadas a 1°C disminuyó la actividad y en las almacenadas a 5°C aumento la actividad de la PME. Sin embargo, no influyó en las muestras almacenadas a 0°C. Como se ha visto en el estudio microestructural, a 0°C el tejido presentó un alto grado de estructuración, tanto en las tratadas como en las no tratadas.

Las muestras almacenadas a 1°C y tratadas presentaron un tejido más estructurado que las no tratadas; esto puede deberse a una menor proporción de pectina desmetoxilada, que es sustrato de otras enzimas. Las muestras almacenadas a 5°C, independientemente de si fueron tratadas o no, se observaron degradadas.

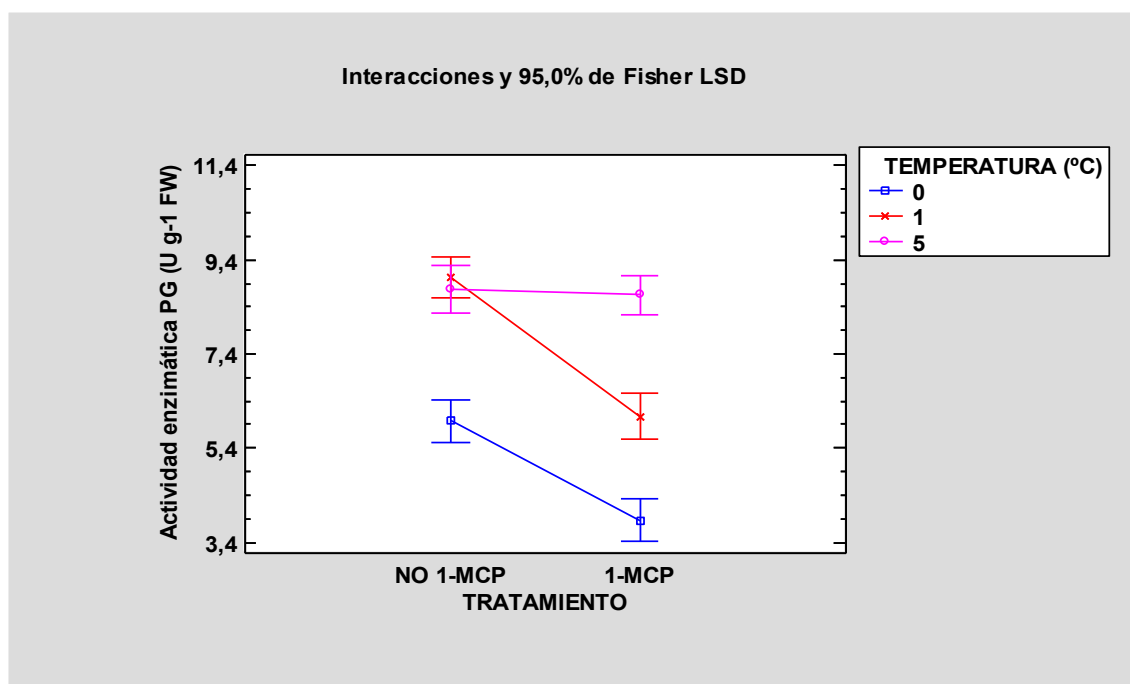


*Figura 7. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la actividad enzimática de PME (U g<sup>-1</sup> FW) en muestras de caqui con un periodo de almacenamiento de 90 días.*

#### 4.4. Actividad enzimática de la poligalacturonasa

Ambos factores, tratamiento con 1-MCP y temperatura de almacenamiento en frío tuvieron un efecto significativo para el parámetro actividad enzimática de la poligalacturonasa (PG). Además, hubo interacciones entre ambos factores para el mismo parámetro. En Anexos se presenta como material suplementario la tabla con el análisis de la varianza multifactorial para la actividad enzimática con los factores temperatura y tratamiento (Tabla Suplementaria TS4).

En la figura 8 se presenta el gráfico de interacciones con los intervalos LSD de las muestras estudiadas en este trabajo. Si se comparan las muestras almacenadas a 0 y 1°C no tratadas y tratadas previamente al almacenamiento con 1-MCP, las no tratadas fueron las que presentaron los valores de actividad enzimática significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevados. Las muestras almacenadas a 5°C, independientemente de si fueron tratadas o no y, las almacenadas a 1°C sin tratamiento fueron las que presentaron los valores más elevados ( $p < 0,05$ ) de actividad de la enzima PG, sin que hubiera diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas. La muestra almacenada a 0°C y tratada previamente con 1-MCP obtuvo los valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajos. Esta muestra es también la que presentó los mayores valores de firmeza. El tratamiento con 1-MCP previo al almacenamiento en frío a 0 y 1°C disminuyó la actividad enzimática de la PG, mientras que a 5°C no causó ningún efecto. El descenso de la actividad enzimática de la PG que produce el tratamiento previo al almacenamiento a 0 y 1°C podría explicar la apariencia estructurada de estas muestras como se ha visto en el apartado de microestructura.



*Figura 8.* Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre tratamiento y temperatura para la actividad enzimática de PG (U g-1 FW) en muestras de caqui con un periodo de almacenamiento de 90 días.

## 5. CONCLUSIONES

El tratamiento postcosecha más adecuado para prolongar la vida comercial del caqui 'Rojo Brillante' durante 90 días parece ser el tratamiento previo de las muestras con 1-metilciclopropeno y el posterior almacenamiento a 0°C. Las muestras de caqui almacenadas 90 días a 0°C presentan valores de firmeza más elevados y un tejido más estructurado e íntegro que las almacenadas a 1 y 5°C. El tratamiento previo al almacenamiento con 1-metilciclopropeno mejora la firmeza y la microestructura cuando el caqui se almacena a 0 y 1°C. Además, disminuye la actividad de la PME y de la PG en las muestras almacenadas a 1°C, y de la PG en las muestras almacenadas a 0°C, lo que podría evitar la degradación estructural del tejido. El tratamiento con 1-metilciclopropeno, sin embargo, no influye en la actividad de las enzimas PME y PG, ni en la estructura de la pulpa del caqui cuando la temperatura de almacenamiento es 5°C. Las muestras de caqui almacenadas 90 días a 5°C presentan una alta degradación estructural.

## 6. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADENES, M. L., GARCÉS, A., ROMERO, C., ROMERO, M., CLAVÉ, J., ROVIRA, M., & LLÁCER, G. (2002). Genetic diversity of persimmon accessions introduced and surveyed in Spain. *Electronico*, 71-73. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/8458>

BESADA, C. (2008). Mejora de la tecnología de desastringencia, conservación y comercialización de caqui «Rojo Brillante» para consumo en fresco [DoctoralThesis]. En *Electronico*. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/7594>

BESADA, C., NOVILLO, P., NAVARRO, P., & SALVADOR, A. (2014). Effect of a low oxygen atmosphere combined with 1-MCP pretreatment on preserving the quality of 'Rojo Brillante' and 'Triumph' persimmon during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 179, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.015>

CAFFALL, K. H., & MOHNEN, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>

DE VRIES, R. P., & VISSER, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), 497-522, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (1997). *FAOSTAT statistical database*, Roma, visto el 16 de julio de 2023. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- FERNÁNDEZ-ZAMUDIO, M. A., y MALAGÓN, J. (2019). Valoración económica de las principales labores del cultivo del caqui. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 416, 19-23. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/6510?locale-attribute=en>
- GOULAO, L. F., & OLIVEIRA, C. M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: When a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 4-25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.002>
- HUBER, D. J., KARAKURT, Y., & JEONG, J. (2001). Pectin degradation in ripening and wounded fruits. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 224-241. <https://doi.org/10.1590/S0103-31312001000200009>
- JARVIS, M. C. (2009). Plant cell walls: Supramolecular assembly, signalling and stress. *Structural Chemistry*, 20(2), 245-253. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9427-y>
- JARVIS, M. C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.010>
- JOLIE, R. P., DUVETTER, T., VAN LOEY, A. M., & HENDRICKX, M. E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: A review. *Carbohydrate Research*, 345(18), 2583-2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.002>
- LIU, M., WANG, R., SUN, W., HAN, W., LI, G., ZONG, W., & FU, J. (2023). Effects of postharvest calcium treatment on the firmness of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit based on a decline in WSP. *Scientia Horticulturae*, 307, 111490. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111490>
- LLÁCER, G., & BADENES, M. L. (2002). Situación actual de la producción de caquis en el mundo. *Agrícola Vergel*, 242, 64-71. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/8670>
- LLÁCER, G., & BADENES, M. L. (2003). Situación actual de la producción de caqui en el mundo. *Comunitat Valenciana Agraria*, 23, 35-46. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/8502>



- LUO, Z. (2007). Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of postharvest persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.10.010>
- MICHELI, F. (2001). Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9), 414-419. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)02045-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)02045-3)
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2023). *Superficies y producciones anuales de cultivos*, Madrid, visto el 15 de julio de 2023 <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- MOHNEN, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- PERUCHO MAÑEZ, RAFAEL. (2019) “El Cultivo Del Caqui. Antecedentes e Importancia Económica En España.” *Distribución y Consumo.*, 29(160), 44–51.
- RIDLEY, B. L., O’NEILL, M. A., & MOHNEN, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- RINAUDO, M. (1996). Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. En *Progress in Biotechnology* 14, 21-33. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80243-7](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80243-7)
- SALVADOR, A., ARNAL, L., BESADA, C., LARREA, V., HERNANDO, I., & PÉREZ-MUNUERA, I. (2008). Reduced effectiveness of the treatment for removing astringency in persimmon fruit when stored at 15°C: Physiological and microstructural study. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.01.015>
- SALVADOR, A., ARNAL, L., MONTERDE, A., & MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. (2005). Influence of Ripening Stage at Harvest on Chilling Injury Symptoms of Persimmon cv. Rojo Brillante Stored at Different Temperatures. *Food Science and Technology International*, 11(5), 359-365. <https://doi.org/10.1177/1082013205057941>
- SALVADOR, A., BESADA, C., & CRISOSTO, C. H. (2020). Persimmon. En *Electronico* , 88-133. CABI. <https://doi.org/10.1079/9781789247176.0088>



SILA, D. N., DUVETTER, T., DE ROECK, A., VERLENT, I., SMOUT, C., MOATES, G. K., HILLS, B. P., WALDRON, K. K., HENDRICKX, M., & VAN LOEY, A. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: Potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 309-319. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.007>

SISLER, E. C., & SEREK, M. (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 577-582. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x>

VILHENA, N. Q., QUILES, A., GIL, R., LLORCA, E., VENDRELL, M., & SALVADOR, A. (2022). Cambios físicoquímicos y microestructurales durante la recolección de caqui "Rojo Brillante" y su influencia en el potencial de conservación. *Levante Agrícola*, 462, 125-130. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/8319>

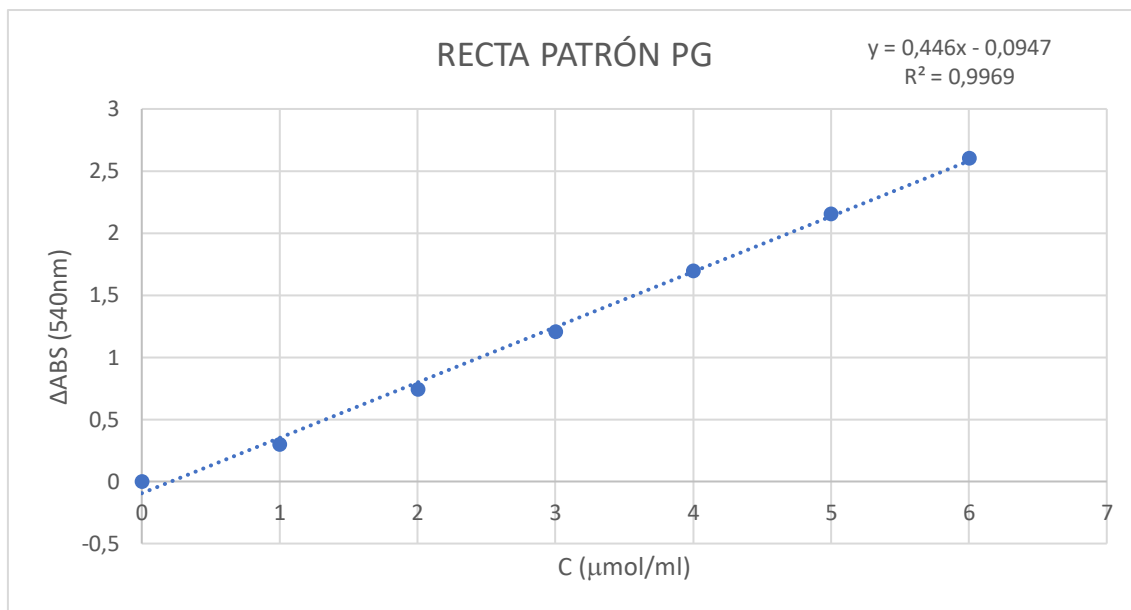
WHITAKER, J. R., VORAGEN, A. G. J., & WONG, D. W. S. (Eds.). (2003). *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker.

ZHANG, W., XU, S., GAO, M., PENG, S., CHEN, L., LAO, F., LIAO, X., & WU, J. (2022). Profiling the water soluble pectin in clear red raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Heritage) juice: Impact of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time processing on the pectin properties. *Food Hydrocolloids*, 125, 107439. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107439>

## ANEXOS

*Tabla Suplementaria 1 (TS1). Grado de relación del TFG con los objetivos de desarrollo sostenible ODS) de la Agenda 2030.*

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenible</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar		X		
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructura		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos				X



**Figura Suplementaria 1 (FS1).** Representación gráfica de la recta de calibrado de la concentración de ácido galacturónico frente al incremento de absorbancia

**Tabla Suplementaria 2 (TS2).** Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la fuerza ejercida sobre muestras de caqui con los factores temperatura y tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: TRATAMIENTO</b>	2426,84	1	2426,84	90,17	<b>0,0000</b>
<b>B: TEMPERATURA</b>	23482,7	2	11741,4	436,26	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
<b>AB</b>	1226,15	2	613,076	22,78	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	2745,21	102	26,9138		
TOTAL (CORREGIDO)	32817,4	107			

**Tabla Suplementaria 3 (TS3).** Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la actividad enzimática de la PME con los factores temperatura y tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: TRATAMIENTO</b>	0,00297735	1	0,00297735	2,68	<b>0,1061</b>
<b>B: TEMPERATURA</b>	0,00469758	2	0,00234879	2,12	<b>0,1284</b>
INTERACCIONES					
<b>AB</b>	0,0160422	2	0,0080211	7,23	<b>0,0014</b>
RESIDUOS	0,0732007	66	0,0011091		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0969179	71			

**Tabla Suplementaria 4 (TS4).** Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para la actividad enzimática de la PG con los factores temperatura y tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: TRATAMIENTO</b>	47,5672	1	47,5672	42,36	<b>0,0000</b>
<b>B: TEMPERATURA</b>	161,377	2	80,6887	71,86	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
<b>AB</b>	21,688	2	10,844	9,66	<b>0,0002</b>
RESIDUOS	65,1292	58	1,12292		
TOTAL (CORREGIDO)	302,248	63			