



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

Impacto del tratamiento con 1-MCP sobre la estructura y
las enzimas de la pared celular del caqui sometido a
conservación en frío y comercialización

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: López Cerezuela, Andrea

Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados

Cotutor/a: Llorca Martínez, M^a Empar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

TÍTULO: Impacto del tratamiento con 1-MCP sobre la estructura y las enzimas de la pared celular del caqui sometido a conservación en frío y comercialización.

RESUMEN: La conservación frigorífica del caqui ‘Rojo Brillante’ es una práctica habitual en su manejo postcosecha y permite alargar su campaña comercial. Sin embargo, el tratamiento por frío puede causar ablandamiento del fruto. El tratamiento con metilciclopropeno (1-MCP) permite reducir los síntomas de daño por frío. En un trabajo anterior se analizó el efecto de la conservación del caqui durante 90 días a diferentes temperaturas (0°, 1° y 5°C) con y sin tratamiento previo con 1-MCP sobre las propiedades estructurales de la pulpa. Se comprobó que el tratamiento con 1-MCP y la conservación a 0°C mantenían mejor las propiedades estructurales del caqui. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto que tiene el tratamiento con 1-MCP previo a la conservación del caqui a 0°C durante dos periodos de conservación, concretamente, 60 y 90 días, sobre el caqui sometido a un periodo de comercialización de 5 días a 20 °C. Para ello, se determinará la firmeza de los frutos, el contenido en taninos solubles y la actividad de las enzimas de pared, pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG), que juegan un papel clave en el ablandamiento del fruto y pérdida de firmeza.

El ODS-3, Salud y bienestar, y el ODS-9, Industria, Innovación e Infraestructuras, están relacionados con este trabajo de la Agenda 2030.

PALABRAS CLAVE: actividad enzimática; PME; PG; firmeza; 1-MCP; vida útil, taninos solubles

TITLE: Effect of 1-MCP treatment on the structure and enzymes of persimmon cell wall during cold storage and distribution

ABSTRACT: Refrigerating 'Rojo Brillante' persimmons is a typical practice to extend their shelf life and keep them fresh for longer during postharvest handling. However, chilling can sometimes lead to fruit softening, which is where methylcyclopropene (1-MCP) treatment comes into play, helping to mitigate these effects. In a previous study, we delved into how storing persimmons for 90 days at various temperatures (0°C, 1°C, and 5°C), with or without prior 1-MCP treatment, affected the structural integrity of the pulp. Our findings showed that using 1-MCP treatment alongside storage at 0°C preserved the fruit's structural properties more effectively.

Building on this, our current study aims to explore the impact of treating persimmons with 1-MCP before storing them at 0°C for either 60 or 90 days. Additionally, we will be assessing how this treatment influences persimmons that undergo a 5-day marketing period at 20°C. To do this, we will be measuring fruit firmness, soluble tannin content, and the activity of key enzymes—pectin methylesterase (PME) and polygalacturonase (PG)—which are known to play crucial roles in fruit softening and loss of firmness.

Our research is not just about improving fruit quality; it is also aligned with broader goals, such as SDG-3 for Good Health and Well-being, and SDG-9 for Industry, Innovation, and Infrastructure, as outlined in the 2030 Agenda.

KEYWORDS: Enzymatic activity, PME, PG, firmness, 1-MCP, shelf life, soluble tannins.

TÍTOL Impacte del tractament amb 1-MCP sobre l'estructura i les enzims de la paret cel·lular del caqui sotmès a conservació en fred i comercialització.

RESUM La conservació frigorífica del caqui 'Rojo Brillante' és una pràctica habitual en el seu maneig postcollita i permet allargar la seua campanya comercial. No obstant això, el tractament per fred pot causar ablaniment del fruit. El tractament amb metilciclopropè (1-MCP) permet reduir els símptomes de dany pel fred. En un treball anterior es va analitzar l'efecte de la conservació del caqui durant 90 dies a diferents temperatures (0°C, 1°C i 5°C) amb i sense tractament previ amb 1-MCP sobre les propietats estructurals de la polpa. Es va comprovar que el tractament amb 1-MCP i la conservació a 0°C mantenia millor les propietats estructurals del caqui. L'objectiu d'aquest treball és estudiar l'efecte que té el tractament amb 1-MCP previ a la conservació del caqui a 0°C durant dos períodes de conservació, concretament, 60 i 90 dies. A més, avaluar aquest efecte sobre el caqui sotmès a un període de comercialització durant 5 dies a 20°C. Per a açò, es determinarà la fermesa dels fruits, el contingut en tanins solubles i l'activitat de les enzims de paret, pectinmetilesterasa (PME) i poligalacturonasa (PG), que juguen un paper clau en l'ablaniment del fruit i la pèrdua de fermesa. L'ODS-3, Salut i benestar, i l'ODS-9, Indústria, Innovació i Infraestructures, estan relacionats amb aquest treball de l'Agenda 2030.

PARAULES CLAU: activitat enzimàtica; PME (pectinmetilesterasa); PG (poligalacturonasa); fermesa; 1-MCP; vida útil; tanins solubles

Autor/a: López Cerezuela, Andrea
Tutor/a: Quiles Chuliá, María Desamparados
Cotutor/a: Llorca Martínez, M^a Empar
Valencia, junio de 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis tutoras, Amparo Quiles y Empar Llorca, darme la oportunidad de conocer una pequeña parte del trabajo de laboratorio. He aprendido que puede ser un lugar al que me ilusione ir por las mañanas y donde me sienta cómoda. Gracias de corazón porque no había descubierto aún cuánto me gustaba. Muchas gracias por ser tan atentas y dedicadas.

Gracias a Helena por enseñarme desde el principio y brindarme su apoyo en todo momento. Sin tu ayuda, probablemente aún estaría en el laboratorio.

A mis padres por animarme a seguir 'nadando' cuando lo necesitaba. A mis dos hermanitas, Ali y Asianchín. La primera va a ser la profesora más amorosa y buena del mundo. La segunda puede seguir existiendo simplemente. A mi amiga Nuri por elegirnos por lo menos 20 años y 20 vidas más.

A Pau. "Un paso más, un paso menos".

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Origen histórico del caqui y evolución.....	1
1.2. Interés del consumo del caqui	1
1.3. Almacenamiento del caqui	2
1.4. Estructura y enzimas de la pared celular	3
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
2.3. Plan de trabajo.....	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. Materiales.....	5
3.2. Métodos	5
3.2.1. Determinación de la firmeza.....	5
3.2.2. Determinación del contenido en taninos solubles	5
<u>3.2.2.1. Preparación de las muestras.....</u>	<u>5</u>
<u>3.2.2.2. Contenido en taninos solubles.....</u>	<u>6</u>
3.2.4 Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa	6
<u>3.2.4.1 Obtención del extracto enzimático</u>	<u>6</u>
<u>3.2.4.2 Determinación de la actividad enzimática.....</u>	<u>6</u>
3.2.5 Actividad enzimática de la poligalacturonasa.....	7
<u>3.2.2.3. Obtención del extracto enzimático</u>	<u>7</u>
<u>3.2.2.4. Determinación de la actividad enzimática.....</u>	<u>7</u>
3.3 Análisis estadístico.....	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	8

4.1. Determinación de la firmeza	8
4.2. Contenido en taninos solubles	8
4.3. Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa	9
4.4. Actividad enzimática de la poligalacturonasa	10
5. CONCLUSIONES.....	12
6. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
ANEXOS	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable firmeza (N) en caqui comercial.	9
Figura 2. Gráfico de medias con intervalos LSD para el factor tiempo de almacenamiento (Tiempo F) para la variable contenido en taninos solubles (ppm) en caqui comercial.	10
Figura 3. Gráfico de medias con intervalos LSD para el factor tratamiento para la variable actividad enzimática de PME (Ug-1FW) en caqui comercial	11
Figura 4. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad de la enzima PG (Ug-1FW) del caqui comercial.	12

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2 2 material suplementario (TS2). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP yNOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable firmeza (N) en caqui comercial.....	16
Tabla 3 material suplementario (TS3). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP yNOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable concentración de taninos (ppm) en caqui comercial.	17
Tabla 4 material suplementario (TS4). Análisis de la varianza ANOVA simple para el factor tiempo de almacenamiento en frío para la variable concentración de taninos (ppm) en caqui comercial.....	17
Tabla 5 material suplementario (TS5) Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP yNOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad enzimática de PME ($Ug^{-1}FW$) en caqui comercial.	17
Tabla 6 material suplementario (TS6). Análisis de la varianza ANOVA simple para el factor tratamiento para la variable variable actividad enzimática de PME ($Ug^{-1}FW$) en caqui comercial.....	17
Tabla 7 material suplementario (TS6). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP yNOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad enzimática de PG ($Ug^{-1}FW$) en caqui comercial.	17

Tabla 1. RELACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
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

Este trabajo tiene un alto grado de relación con el ODS 3: Salud y Bienestar ya que trata de prolongar la disponibilidad comercial del fruto del caqui. Este fruto tiene gran cantidad de compuestos bioactivos como los polifenoles, la vitamina C o la provitamina A.

También tiene un alto grado de relación con el ODS 9: Industria, innovación e infraestructura. Gracias a la investigación sobre los tratamientos postcosecha se mejora la calidad y productividad en el proceso de obtención del caqui. Además, conseguimos conocer en mayor profundidad los efectos que tiene la aplicación de nuevos tratamientos, como el 1-MCP y sus beneficios.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen histórico del caqui y evolución

El caqui, científicamente conocido como *Diospyros kaki*, es un fruto ampliamente cultivado y consumido en diversas partes del mundo debido a su sabor dulce, textura jugosa y rica composición nutricional. Originario de China, de donde pasó a Corea y Japón, su producción y consumo han experimentado un notable aumento en las últimas décadas, impulsado tanto por sus cualidades organolépticas como por sus beneficios nutricionales. Actualmente, España figura como uno de los mayores productores mundiales, junto con Brasil, Italia, Israel y China, el principal productor a nivel mundial (Badenes et al., 2012).

La llegada de este fruto a Europa no está documentada con precisión, aunque existen registros que datan del año 79 d.C., gracias a la obra *Historia Naturalis* de Plinio el Viejo (24-79 d.C.). En ella se mencionan árboles de loto, el nombre por el cual se conocía al caqui en Grecia e Italia. Con el paso de los siglos y gracias a la diversidad genética del género *Diospyros*, se han desarrollado especies con diversas características de reproducción y maduración. Este hecho resalta la importancia de estudiar cada variedad por separado con el objetivo de mejorar tanto la cantidad como la calidad de la producción. En un estudio cooperativo entre investigadores japoneses, italianos y estadounidenses (Yamada et al., 2012), se examinaron los genotipos del caqui de origen italiano, español, japonés, coreano, chino y de origen desconocido. Los resultados indicaron que los cultivares españoles e italianos podrían compartir un origen genético común, a diferencia de los cultivares japoneses, chinos y coreanos, que mostraban agrupamientos genéticos separados. Además de esta diferenciación genética, es importante considerar las particularidades del cultivo de cada variante de caqui, especialmente en cuanto a su maduración.

Las variedades de caqui se dividen desde el punto de vista comercial en astringentes ('Rojo Brillante', 'Triumph', 'Tomatero', 'Fuji', 'Hachiya', 'Atago', etc.) y no-astringentes ('Fuyu', 'Hana-Fuyu', 'Jiro', 'Suroga', etc.). La astringencia está ligada al contenido y forma de los taninos. En las variedades no-astringentes los taninos están insolubilizados permitiendo su consumo sin la realización de ningún tratamiento en postcosecha y sin alcanzar la madurez fisiológica. Estos frutos pueden consumirse en estado firme. Las variedades astringentes tienen un elevado contenido en taninos solubles que va disminuyendo a medida que se alcanza la madurez. Sin embargo, es necesario recolectar los caquis inmaduros para que sea posible el transporte y manejo del fruto. Por ello las variedades astringentes precisan de un proceso de sobremaduración o de eliminación de la astringencia antes de su comercialización y consumo. El método que ha demostrado ser más efectivo para eliminar la astringencia y el que se emplea actualmente es la aplicación de atmósferas con altas concentraciones de CO₂, ya que elimina la astringencia preservando su firmeza (Arnal y Del Río, 2003; Salvador et al., 2004; Besada et al., 2015). El consumo de las variedades astringentes sin tratamiento de desastringencia solo es posible una vez que el fruto está muy maduro y tiene una consistencia demasiado blanda para comercializarlo fácilmente. Los frutos sometidos a tratamiento de desastringencia sí que se pueden consumir en estado firme y se conocen comercialmente con el nombre de Persimon. Actualmente, en países como Japón, China o Corea, los frutos astringentes se comercializan blandos, a pesar de sus limitaciones. En España, todos los cultivares con Denominación de origen son astringentes, destacando entre ellos la variedad más importante, el caqui 'Rojo Brillante'. En el mercado se puede encontrar caqui 'Rojo Brillante blando (sobremadurado) o firme, es decir como Persimon (sometido a tratamiento de desastringencia) (Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2010; KAKI PERSIMON, 2024).

1.2. Interés del consumo del caqui

En los últimos años, la preocupación de los consumidores por mantener una dieta saludable ha aumentado considerablemente, impulsada por investigaciones que vinculan ciertas enfermedades con determinados hábitos alimenticios. Se ha demostrado que las dietas pobres en granos enteros, frutas, frutos secos (sin sal) y semillas, verduras, ácidos grasos ω -3 de alta cadena, fibra, legumbres, calcio o leche, así como,

aquellas con un alto contenido en sodio, bebidas azucaradas, carne procesada o carne roja, pueden aumentar el riesgo de padecer ciertas patologías. Además, se ha observado que el consumo regular de frutas y verduras está asociado con la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades, incluyendo el cáncer y trastornos cardiovasculares (Choudhary et al., 2023).

Respecto a la composición nutricional del caqui 'Rojo Brillante', el componente mayoritario es el agua, que representa aproximadamente 80 g de cada 100g de fruta (Díaz et al., 2020). El contenido en hidratos de carbono es del 16%, entre los cuales, los principales son la fructosa y la glucosa (Moreiras et al., 2013). El contenido en grasas y proteínas no llega al gramo por cada 100 g de fruta. Sin embargo, destaca el contenido en ácidos grasos beneficiosos nutricionalmente como el linoleico, oleico y palmítico. El caqui es rico en provitamina A (b-criptoxantina), carotenoide responsable de la coloración de los frutos que al metabolizarse en el organismo se transforma en vitamina A. La ingesta de vitamina A está relacionada con la disminución de la mortalidad, menor riesgo de padecer enfermedades crónicas y menor incidencia en la degradación de la mácula de la retina (Bohn et al., 2021). Además, su color naranja característico se debe al β -caroteno, carotenoide con actividad antioxidante. Otra vitamina destacable por su elevada concentración en el caqui es la vitamina C. Una pieza de fruta de tamaño medio aporta 16 de los 60 mg de Vitamina C de las ingestas diarias recomendadas de esta vitamina. Se considera que este compuesto tiene propiedades anticancerígenas y antioxidantes (Berretta et al., 2020). El caqui contiene fibra soluble en forma de pectina y mucílagos, la cual reduce el riesgo de padecer enfermedades gastrointestinales como el síndrome del intestino, la enfermedad diverticular, el estreñimiento funcional, la incontinencia fecal y el cáncer colorrectal (Guan et al., 2021). Además de los nutrientes beneficiosos nombrados contiene minerales como el potasio, y en menor cantidad calcio, fósforo, hierro, magnesio y sodio. El potasio interviene en la transmisión de señales, especialmente, en la generación del impulso nervioso y en la actividad muscular normal. Las vitaminas del grupo B (B1, B2 y B3) también se encuentran presentes en el caqui, aunque en menor proporción (Díaz et al., 2020).

El caqui 'Rojo Brillante' debe su astringencia a la elevada concentración de taninos solubles, presentes en grandes células especializadas dispersas por toda la pulpa de la fruta, conocidas como células tánicas. Estos taninos vegetales, polifenoles complejos con un peso molecular en el rango de 500-3000 Da, se clasifican según su estructura química en hidrolizables o condensados, siendo estos últimos subdivididos en solubles e insolubles. La sensación de astringencia que producen los taninos se debe a que favorecen la precipitación de sustancias como la gelatina, alcaloides y otras proteínas, especialmente las de la saliva en la boca (Yang et al., 2023). A pesar de este efecto negativo, diferentes estudios han demostrado que los polifenoles poseen propiedades antioxidantes, previniendo el estrés oxidativo y estados patológicos como el envejecimiento, la diabetes, el cáncer o el Alzheimer (Choudhary et al., 2023).

El caqui 'Rojo Brillante' es un fruto estacionario, su recolección tiene lugar entre mediados de octubre y finales de noviembre y, se suele comercializar durante el último trimestre del año. Sin embargo, debido a su elevado valor nutricional sería interesante alargar su periodo de comercialización. Para alcanzar este objetivo se están realizando numerosas investigaciones sobre tratamientos postcosecha.

1.3. Almacenamiento del caqui

En España, el caqui de la variedad 'Rojo Brillante' se cultiva principalmente en la Comunidad Valenciana. Al ser un fruto climatérico astringente, el fruto se somete a un proceso de desastringencia basado en el almacenamiento a temperatura controlada y en atmósfera enriquecida con una alta concentración de CO₂ (95% a 98%) (Salvador et al., 2008). Este método favorece la producción de acetaldehído que en condiciones anaeróbicas reacciona con los taninos solubles formando moléculas insolubles en agua, reduciendo la concentración de compuestos que causan la astringencia. Como resultado se obtienen frutos no astringentes de pulpa firme (Persimon). El tratamiento de desastringencia puede realizarse antes o después del almacenamiento del caqui.

Debido a la alta producción y al corto periodo de comercialización del caqui, se hace necesario introducir nuevas técnicas postcosecha que permitan alargar el 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

utiliza en 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 se disminuye la pérdida de humedad del fruto. Sin embargo, el uso de temperaturas inadecuadas puede ocasionar alteraciones fisiológicas graves denominadas ‘daños por frío’ (Salvador et al., 2020), como la pérdida de firmeza o la gelificación de la pulpa (Besada et al., 2015).

Para dar solución a este problema se está investigando el uso de 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor eficaz de la acción del etileno que retrasa los procesos de maduración y senescencia, y reduce los trastornos fisiológicos de las frutas y verduras (Salvador et al., 2004; Salvador et al., 2008). Se ha demostrado la eficacia del 1-MCP para mantener la firmeza en el caqui ‘Rojo Brillante’, prolongando así su vida postcosecha, en condiciones de atmosferas controladas empleando O₂ y N₂ (Arnal et al., 2008; Besada et al., 2014). Sin embargo, no se conoce la eficacia del tratamiento con 1-MCP en caqui que se va a someter a periodos prolongados de conservación en frío. Tampoco se conoce la influencia del tratamiento con 1-MCP en caqui comercial después de haber sido sometido a un periodo de conservación en frío.

1.4. Estructura y enzimas de la pared celular

Las células vegetales tienen en su exterior la pared celular. Esta estructura rodea la membrana celular y cumple varias funciones cruciales para la célula. La pared celular es esencial para mantener la integridad estructural, proteger a la célula, regular la presión osmótica en el interior celular y regular la comunicación entre células. De la pared celular depende la integridad celular, por lo que, es necesario entender y estudiar el papel de las enzimas de la pared celular, que son fundamentales para la construcción, mantenimiento y remodelación de esta estructura.

Las paredes celulares vegetales son estructuras diversas y complejas compuestas por hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Las proteínas, aunque son menos abundantes, cumplen múltiples funciones vitales, incluida la actividad enzimática, el transporte de solutos, la comunicación intracelular y la protección. Los hidratos de carbono principales que forman la pared celular son la celulosa, las hemicelulosas y las pectinas. La celulosa es un polímero de glucosa que forma largas cadenas lineales. Estas cadenas de celulosa se organizan en estructuras altamente ordenadas llamadas microfibrillas. Las microfibrillas tienen una gran resistencia a la tensión, lo que proporciona rigidez y estabilidad a la pared celular. Las microfibrillas de celulosa se entrelazan en una matriz compleja que contiene otros polisacáridos como hemicelulosa y pectina y también proteínas. Esta matriz contribuye a la flexibilidad y la integridad estructural de la pared celular. La celulosa es resistente a la degradación enzimática, lo que contribuye a la protección de la célula. Las hemicelulosas son polímeros más ramificados y menos rígidos por lo que aportan flexibilidad a la pared celular. Se cree que forman enlaces de hidrógeno con las fibrillas de celulosa y los espacios entre ellos. Este complejo celulosa-hemicelulosa está, a su vez, inmerso en una matriz de pectina y proteínas estructurales. Las pectinas son una familia de polisacáridos estructuralmente compleja compuesta en gran proporción por ácido galacturónico unido covalentemente mediante enlaces alfa-1,4 que pueden estar metilesterificados en el carboxilo del carbono C-6 (Mohnen, 2008).

Los procesos madurativos en frutos climatéricos se activan por el aumento de la hormona etileno y reguladores transcripcionales. Como resultado se transportan y generan proteínas enzimáticas con distintas funciones (Tucker et al., 2017). Algunas de estas proteínas, como la pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG) tienen como sustrato la pectina de la pared celular. La PME es una enzima hidrolítica del grupo éster metílico. Cataliza la desmetoxilación del C-6 del ácido galacturónico que conforma los polisacáridos pécticos. Al convertirse en pectinas desmetiladas son más susceptibles a la actividad enzimática, permitiendo el ablandamiento de la pared celular durante el crecimiento de las células vegetales o el proceso de maduración de los frutos.

La PG actúa preferentemente sobre el sustrato desmetilado, hidrolizando el enlace glicosídico α -1,4 que une dos residuos de ácido galacturónico de pectinas poco metilesterificadas. La PG puede ser clasificada como endo-PG, que hidroliza la pectina de manera aleatoria en el interior de la cadena y produce una rápida disminución de la viscosidad, o exo-PG, que produce moléculas libres de ácido poligalacturónico.

La actividad de la PME precede a la actividad de la PG en la fruta de caqui, lo que indica una acción

coordinada entre ambas enzimas en el proceso de despolimerización de polisacáridos pécticos durante la maduración de los frutos. Con la modificación se disuelve la lámina media y da lugar a la desorganización de la pared celular primaria. Además del cambio de estructuras y propiedades fisicoquímicas, se ablandan los tejidos y se transforman macromoléculas.

Durante la conservación del caqui en frío se pueden ralentizar en mayor o menor medida algunos procesos bioquímicos, pero no paralizarlos por completo. El uso del 1-MCP inhibe la acción del etileno, lo que, podría ralentizar la actividad de las enzimas de la pared celular PME y PG (Luo, 2007). Su aplicación como tratamiento postcosecha podría ser muy efectivo, reduciendo la pérdida de firmeza y reblandecimiento del caqui.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es analizar el efecto que tiene el tratamiento con 1-MCP, previo a la conservación del caqui a 0°C durante dos periodos de almacenamiento, 60 y 90 días, sobre la estructura y las enzimas de pared del caqui 'Rojo Brillante' sometido a condiciones de comercialización, concretamente, 5 días a 20 °C. Para ello, se ha determinado la firmeza de los frutos, el contenido en taninos solubles y la actividad de las enzimas de pared, pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG).

2.2. Objetivos específicos

Se establecen algunos objetivos específicos para alcanzar el objetivo general:

1. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre la firmeza del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 60 d y a un periodo de comercialización de 5 d a 20°C.
2. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre la firmeza del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 90 d y a un periodo de comercialización de 5 d a 20°C.
3. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre el contenido en taninos solubles del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 60 d y aun periodo de comercialización de 5 d a 20°C.
4. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre el contenido en taninos solubles del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 90 d y a un periodo de comercialización de 5 d a 20°C.
5. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre la actividad enzimática de la PME y PG del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 60 d y a un periodo de comercialización de 5 d a 20°C.
6. Determinar el impacto del tratamiento con 1-MCP, sobre la actividad enzimática de la PME y PG del caqui sometido a un periodo de conservación a 0° durante 90 d y a un periodo de comercialización de 5 d a 20°C.

El objetivo de este trabajo está relacionado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). En particular con el ODS de 'Salud y Bienestar', ya que, busca garantizar que los consumidores tengan acceso a un producto nutricionalmente valioso y de mayor vida útil. También con el ODS 9 'Industria, Innovación e Infraestructuras', ya que persigue optimizar e innovar a nivel industrial el tratamiento postcosecha del caqui. (Anexos, TS1)

2.3. 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-metilciclopropeno (1-MCP).
2. Determinación de la firmeza de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP, almacenado a 0°C durante 60 y 90 d, y sometido a condiciones de comercialización durante 5 d a 20°C.
 3. Determinación del contenido en taninos solubles de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP, almacenado a 0°C durante 60 y 90 d y expuesto a condiciones de comercialización durante 5 d a 20°C.
 4. Obtención de extractos de las enzimas PG y PME a partir de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP, almacenado a 0°C durante 60 y 90 d, y expuesto a condiciones de comercialización durante 5 d a 20°C.
 5. Determinación de la actividad enzimática de las enzimas PG y PME de caqui sometido a un tratamiento de conservación con 1-MCP, almacenado a 0°C durante 60 y 90 d, y sometido a condiciones de comercialización durante 5 d a 20°C.
 6. Análisis, redacción y discusión de los resultados obtenidos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para el desarrollo de este trabajo se estudiaron muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ cedidas por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) pertenecientes a la cosecha del año 2022. A los frutos se les aplicó un tratamiento de conservación con 1-metilciclopropeno (1-MCP) bajo condiciones comerciales (500 nL/L de 1-MCP durante 24 h a 1°C). La mitad de las muestras se almacenaron en frío a 0°C durante 60 d y la otra mitad durante 90 d. Tras el periodo de almacenamiento en frío todos los frutos fueron sometidos a un tratamiento para eliminar la astringencia que consistió en una atmósfera de dióxido de carbono al 95 % durante 24 h a 20°C y humedad relativa del 90 %. Por último, las muestras se almacenaron en condiciones de comercialización, concretamente, 5 d a 20°C. Las muestras estudiadas fueron la 60-MCP (tratado con 1-MCP, almacenado 60 d a 0°C y 5 d a 20°C), 60-NOMCP (almacenado 60 d a 0°C y 5 d a 20°C), 90-MCP (tratado con 1-MCP, almacenado 90 d a 0°C y 5 d a 20°C) y 90-NOMCP (almacenada 90 d a 0°C y 5 d a 20°C).

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. 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.

3.2.2. Determinación del contenido en taninos solubles

3.2.2.1. Preparación de las muestras

Con la finalidad de extraer los taninos solubles de la muestra para su posterior determinación, se introdujo 5 g de puré y 25 mL de metanol 80% en un tubo de centrifuga. La mezcla se homogeneizó con un Ultraturrax (T25 Digital, IKA- Werke, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min y posteriormente se centrifugó (Sorvall Super T21 Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, Wilmington, DE, USA) a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se recogió en un matraz de 100 mL, se filtró con un papel de filtro y se guardó en refrigeración. El residuo sólido se sometió a una segunda extracción. Una vez reunidos los sobrenadantes se enrasó el matraz a 100 mL con agua destilada. Sobre este extracto se determinó el contenido en taninos solubles.

3.2.2.2. Contenido en taninos solubles

En un tubo de ensayo se introdujo 1 mL de extracto, 6 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo Folin y la mezcla se dejó reaccionar durante 3 min. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 mL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) y 1,5 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, la mezcla se homogeneizó y se tomó una alícuota de 300 µL, que se introdujo en una placa multipocillos (96-well NUN F-bottom Microwell plate) para leer su absorbancia a 725 nm en el Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland.

La fórmula para el cálculo de concentración de taninos (ppm) se presenta a continuación (EC1) y se obtuvo mediante la curva patrón (FS1 material suplementario en Anexos):

$$\text{Concentración de taninos (ppm)} = \frac{(\text{Abs}-0.0873)}{0.0077} \quad (\text{EC1})$$

3.2.4 Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa

3.2.4.1 Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático para la determinación de la pectinmetilesterasa (PME) se obtuvo por el método descrito por Liu et al. (2023) con modificaciones. Para la extracción de la enzima se introdujo 1g de muestra de puré de caqui con 6 mL de disolución de NaCl al 8,8% (p/v) que incluía 10 g/L de polivinilpirrolidona (PVPP). Tras la homogeneización en Ultraturax (T25 Digital, IKA- Werke, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min, la mezcla se agitó durante 1 h a 4°C. A continuación, se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C con el objetivo de recoger el sobrenadante que contenía el extracto enzimático para la posterior determinación de la actividad enzimática. Este proceso se repitió una vez más añadiendo 6 mL de disolución de NaCl al 8,8% (p/v) con 10 g/L de polivinilpirrolidona (PVPP), en las mismas condiciones. Se unieron ambos sobrenadantes. El pH del extracto obtenido se ajustó a 7,5 con NaOH 0,25M. Por último, el extracto se dividió en eppendorfs de 2 mL que se almacenaron a -80°C hasta la determinación de la actividad enzimática.

3.2.4.2 Determinación de la actividad enzimática

Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de la PME siguiendo el procedimiento detallado por Zhang et al. (2022). En un tubo de ensayo se añadió 1 mL de disolución de pectina 0,05% (p/v) (pH 7,5), 0,1 mL de disolución de azul bromotimol 0,01 % (p/v) previamente disuelta en tampón fosfato 0,3 M (pH 7,5) y 0,75 mL de agua destilada. La mezcla se agitó para su completa disolución, se homogeneizó y se incubó en un baño de agua a 40°C durante 30 min. A continuación, en el tubo se añadió 0,1 mL del extracto enzimático y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm a los 10 s y a los 130 s utilizando un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Maddison, EE. UU.).

Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la ecuación EC2:

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

Donde:

A₁₀: Absorbancia medida a los 10 s de reacción.

A₁₃₀: Absorbancia medida a los 130 s de reacción.

V: mL de tampón de extracción (12 mL).

W: peso de la muestra (1 g).

t: tiempo de reacción (2 min).

La actividad de la PME se expresó en U g⁻¹ FW. Una unidad de actividad enzimática se definió como un cambio de absorbancia de 0.01/min.

3.2.5 Actividad enzimática de la poligalacturonasa

3.2.2.3. Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático para la determinación de la poligalacturonasa (PG) se obtuvo por el método descrito por Liu et al. (2023) salvo modificaciones. Se introdujeron 5 g de muestra en tubos de centrifuga con 20 mL de etanol al 96%, la mezcla se homogeneizó en Ultraturrax (T25 Digital, IKA- Werke, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido del centrifugado se descartó y se volvió a realizar el proceso de centrifugado dos veces más con el residuo sólido añadiendo 10 mL de etanol al 80% cada vez. Tras esto se añadieron al residuo 5 mL de tampón de extracción compuesto por una disolución de 1.8 mol/L de NaCl, tampón de ácido acético-acetato de sodio 50 mmol/L (pH 5.5). La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se aforó a 10 mL con el tampón de extracción, se dividió en eppendorfs y se almacenó a -80°C hasta la determinación enzimática.

3.2.2.4. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó utilizando el método descrito por Liu et al. (2023), con modificaciones. Se mezcló 0,5 mL de extracto enzimático de poligalacturonasa, 1 mL de disolución tampón de ácido acético-acetato de sodio 50 mmol/L (pH 5.5) y ácido poligalacturónico al 0,5% (p/v) y 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (44 mmol/L). Se preparó un blanco con 0,5 mL de agua destilada, 1 mL de disolución de tampón de ácido acético-acetato de sodio 50 mmol/L (pH 5.5) y ácido poligalacturónico al 0,5% (p/v) y 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (44 mmol/L). La reacción se llevó a cabo introduciendo la mezcla durante 1 h en un baño de agua de 37°C. La reacción se paró introduciendo el tubo en un baño de agua hirviendo durante 5 min. A continuación, la mezcla se atemperó y se midió la absorbancia a 540 nm mediante un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Maddison, USA).

Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la ecuación EC3:

$$\text{Actividad enzimática PG (U g}^{-1}\text{FW)} = X \cdot V / W / t \quad (\text{EC3})$$

Donde:

x: concentración de ácido galacturónico obtenida a partir de la recta de calibrado (mmol/mL)

V: mL de tampón de extracción (10 mL)

W: gramos de muestra (5 g)

t: tiempo de reacción en horas (1 h)

La actividad de la PG se define como $\text{U g}^{-1}\text{FW}$. 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 (FS2 material suplementario en Anexos).

3.3 Análisis estadístico

El programa Statgraphics Centurion XVIII (Statpoint Technologies Inc. USA) se utilizó para analizar estadísticamente los resultados. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para evaluar el impacto del tratamiento con 1-MCP y el periodo de conservación posterior (60 y 90 días a 0°C) sobre la firmeza, el contenido en taninos solubles y la actividad enzimática de PG y PME en muestras de caqui. Se realizaron ANOVAS simples cuando no hubo interacción entre factores. Se utilizó el método de diferencia mínimamente significativa (LSD) a un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05) para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

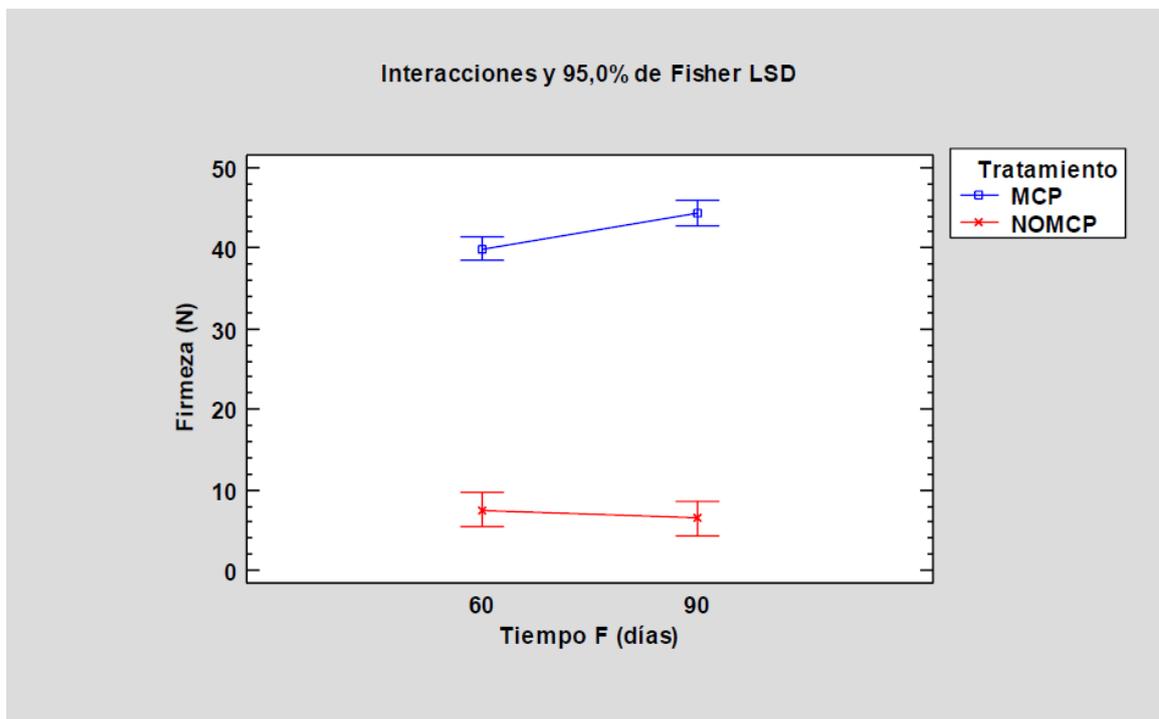
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Determinación de la firmeza

El análisis de varianza multifactorial (ANOVA) de los valores de firmeza de las muestras de caqui comercial mostró (TS1 material suplementario en Anexos) que sí que hubo interacción significativa ($p < 0,05$) entre los dos factores estudiados, tratamiento con 1-MCP y duración del periodo de conservación a 0°C (60 y 90 d), con un valor de p de 0,0475. Aunque esta interacción alcanza significancia estadística, su valor es moderado. Estas muestras, una vez finalizado su periodo de conservación en frío, fueron sometidas a un periodo simulado de comercialización estándar, concretamente, 5 d a 20°C . En estas condiciones, en la fruta se producen cambios estructurales que pueden minimizar los efectos de la conservación en frío.

Los resultados de firmeza, expresados como la fuerza en Newtons (N) requerida para romper la pulpa en la zona ecuatorial, de las muestras de caqui comercial estudiadas en este trabajo (60-MCP, 60-NOMCP, 90-MCP y 90-NOMCP) se presentan en la Figura 1. Si se compara entre las muestras comerciales tratadas con 1-MCP y las no tratadas, los valores significativamente ($p < 0,05$) más altos de firmeza los presentaron las muestras tratadas, para ambos periodos de conservación en frío (60 y 90 días). El tratamiento con 1-MCP proporciona frutos comerciales de mayor firmeza. Estos resultados coinciden con los de Salvador et al. (2004) que demostraron que el tratamiento con 1-MCP aumentaba los valores de firmeza en el caqui “Rojo Brillante”, así como en otras frutas como la manzana, albaricoque y aguacate. Cuando las muestras fueron tratadas con 1-MCP existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las conservadas en frío durante 60 y 90 días, presentando los valores significativamente más elevados ($p < 0,05$) las almacenadas durante 90 días (90-MCP; $44,29 \pm 5,92$) que las almacenadas 60 días (60-MCP; $39,94 \pm 5,23$). El caqui ‘Rojo Brillante’ puede presentar modificaciones en la pared celular tras el periodo de frío, lo que se traduce en una textura más firme y gomosa (Salvador et al., 2005, Salvador et al., 2020). Este fenómeno podría explicar porque las muestras tratadas con 1-MCP y almacenadas 90 días en frío (90MCP) exhibieron valores de firmeza elevados. Sin embargo, cuando las muestras no fueron tratadas con 1-MCP no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las conservadas durante 60 (60-NOMCP; $7,55 \pm 3,31$) y 90 días (90-NOMCP; $6,50 \pm 2,11$) a 0°C .

Figura 1. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable firmeza (N) en caqui comercial.

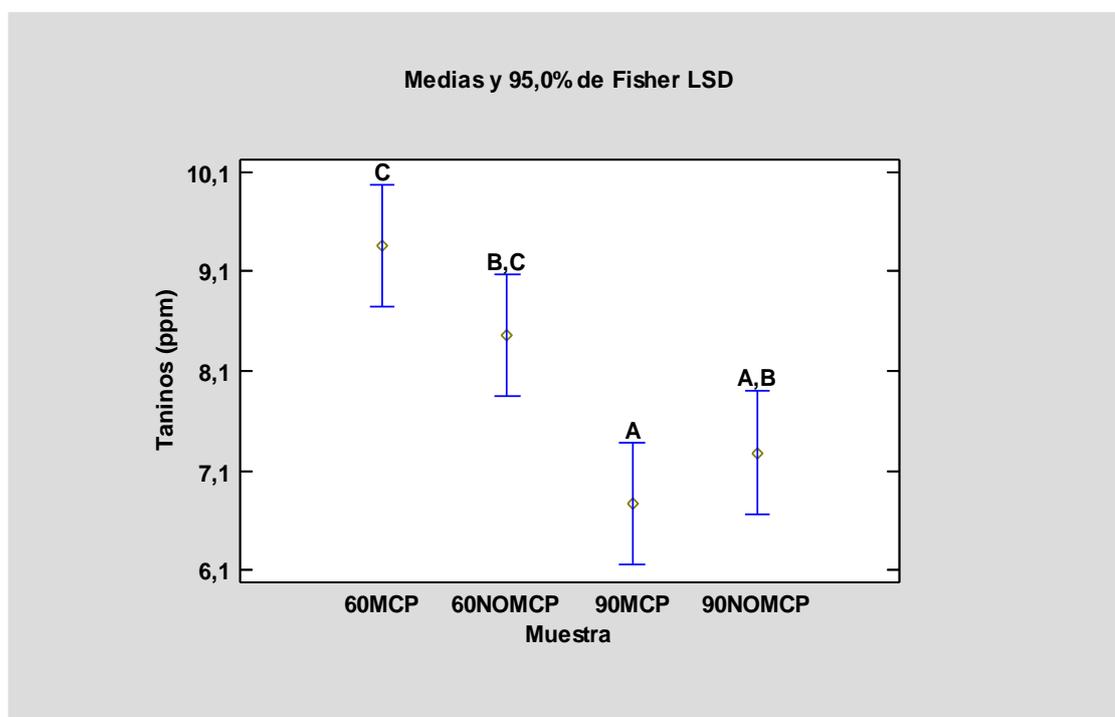


4.2. Contenido en taninos solubles

El análisis de varianza multifactorial (ANOVA) de los valores del contenido en taninos solubles para las muestras de caqui comercial reflejó (TS2 material suplementario en Anexos) que no hubo interacciones entre los dos factores estudiados. Sin embargo, existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor tiempo de conservación en frío, pero no para el factor tratamiento con 1-MCP. Los taninos solubles son los responsables de la sensación de astringencia en boca al precipitar en contacto con las proteínas de la saliva (Amorim et al., 2023). Tras el tratamiento de desastringencia al que los frutos fueron sometidos después del periodo de conservación a 0°C, la concentración de taninos solubles no superó las 10 ppm en ninguna de las muestras de caqui comercial. En el estudio de Besada et al. (2014) se consideraron como frutos no astringentes los que tenían menos de 300-400 ppm de contenido de sólidos solubles tras la evaluación sensorial. El tratamiento con 1-MCP, por lo tanto, no pareció interferir en el proceso de desastringencia.

Como se puede observar en la Figura 2, las muestras de caqui comercial 60-MCP presentaron valores significativamente ($p < 0,05$) (TS3 material suplementario en Anexos) superiores de contenido en taninos solubles que las muestras comerciales conservadas durante 90 días en frío (90-MCP y 90-NOMCP). Sin embargo, el caqui 60-MCP no presentó diferencias con el caqui 60-NOMCP. Si se comparan las muestras sometidas al mismo periodo de conservación en frío no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las tratadas con 1-MCP y las no tratadas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Besada et al. (2014) en su trabajo que demostraron que existía una relación entre el menor contenido en taninos solubles y el mayor tiempo de almacenamiento en frío en muestras de caqui 'Rojo Brillante'. La concentración de taninos solubles disminuyó un 56% durante el almacenamiento en frío a 1°C y un 92,5% tras el tratamiento de desastringencia, independientemente de si las muestras se habían sometido, además de al tratamiento con 1-MCP, a conservación en aire o en atmósfera controlada. También coinciden con los resultados concluidos por Salvador et al. (2004) que observaron que el tratamiento con 1-MCP no influía en el tratamiento de desastringencia y, por lo tanto, en el contenido en taninos en el caqui comercial.

Figura 2. Gráfico de medias con intervalos LSD para el factor tiempo de almacenamiento (Tiempo F) para la variable contenido en taninos solubles (ppm) en caqui comercial.



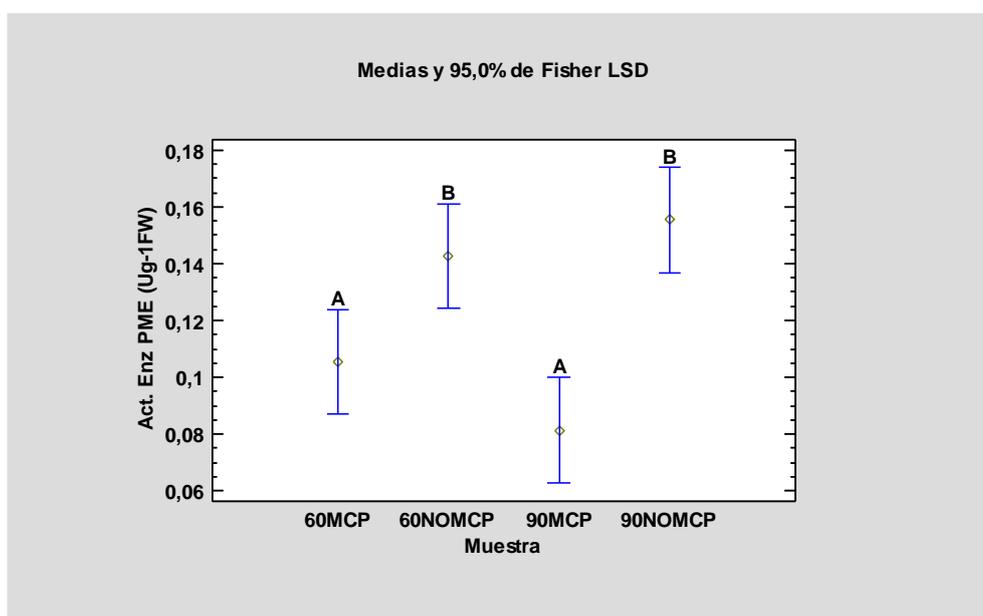
4.3. Actividad enzimática de la pectinmetilesterasa

De los dos factores estudiados, tratamiento y duración del periodo de conservación a 0°C, los resultados del análisis de varianza multifactorial (ANOVA) confirman que, únicamente, el factor tratamiento tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) sobre la actividad enzimática de la PME. Además, no existieron interacciones significativas ($p > 0,05$) entre ambos factores (TS4 material suplementario en Anexos). En la figura 3 se puede observar que no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (TS5 material suplementario en Anexos) las muestras sometidas a distintos periodos de conservación y el mismo tratamiento, es decir, no hubo diferencias ni entre las muestras 60-MCP y 90-MCP ni entre 60-NOMCP y 90-NOMCP. Sin embargo, si se tiene en cuenta el mismo periodo de conservación en frío, las muestras tratadas con 1-MCP mostraron valores de actividad enzimática de PME significativamente ($p < 0,05$) menores que las no tratadas.

Un efecto similar se ha observado en otras frutas y verduras. En el estudio realizado por Alkan et al. (2023) se estudió la composición de la pared celular en berenjenas y las enzimas que actúan sobre ésta en relación con el uso de diferentes tratamientos, entre ellos 1-MCP. Se comprobó que la aplicación del tratamiento 1-MCP tenía como resultado la reducción de la actividad de la enzima PME. Además, se estudió el efecto del tratamiento, según diferentes tiempos de almacenamiento en frío, no siendo significativo este parámetro, tal como ocurre en las muestras estudiadas en este trabajo. En el estudio de Win et al. (2021) se observó que el tratamiento con 1-MCP redujo la actividad de la PME en las variedades de manzana ‘Hwangok’ y ‘Picnic’.

Las muestras de caqui comercial tratadas con 1-MCP exhibieron una disminución en su actividad enzimática de PME, correspondiendo, además, con los mayores niveles de firmeza como se puede ver en el apartado correspondiente. La enzima PME cataliza la desmetoxilación del C-6 del ácido galacturónico, componente de los polisacáridos pécticos que forman parte de la estructura de la pared celular, haciéndolos más susceptibles a la acción de otras enzimas como la poligalacturonasa (PG). Por ello, la menor actividad de la enzima contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared celular y previene la descomposición del tejido, dando como resultado frutos con mayor consistencia (Luo, 2007).

Figura 3. Gráfico de medias con intervalos LSD para el factor tratamiento para la variable actividad enzimática de PME (Ug-1FW) en caqui comercial



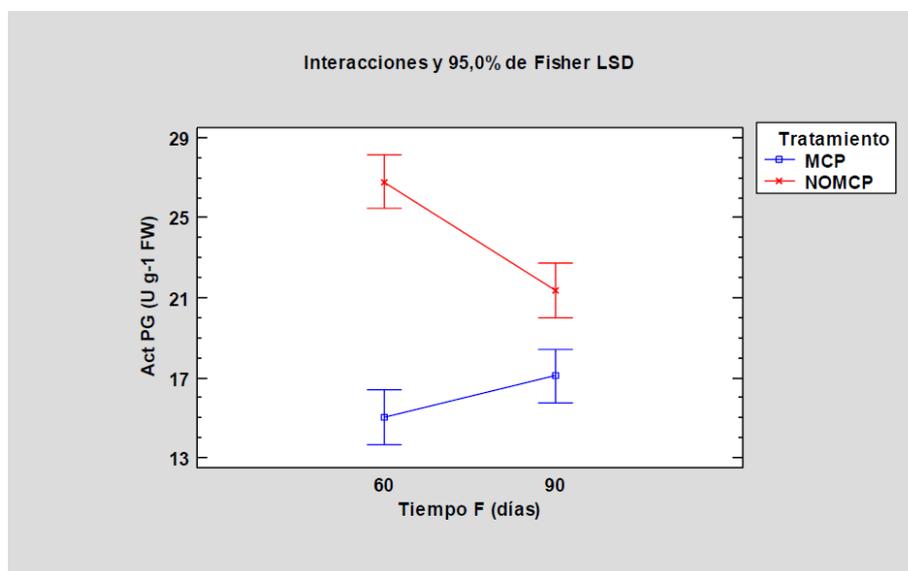
4.4. Actividad enzimática de la poligalacturonasa

Tras el análisis estadístico de los valores de la actividad enzimática de la PG de las muestras comerciales de caqui se pudo observar que el tratamiento con 1-MCP tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la actividad de esta enzima, pero no el tiempo de conservación en frío. Si que hubo interacción significativa ($p < 0,05$) entre los dos factores estudiados, tratamiento y tiempo de conservación (TS6 material suplementario en Anexos). Como se puede apreciar en la Figura 4 las muestras no tratadas con 1-MCP mostraron los mayores valores de actividad de la PG, siendo la muestra 60-NOMCP la que presentó los valores significativamente ($p < 0,05$) más elevados, seguida de la muestra 90-NOMCP. Las muestras tratadas con 1-MCP, independientemente del tiempo de conservación en frío, mostraron los valores significativamente ($P < 0,05$) menores de actividad enzimática, sin presentar diferencias entre ellas. Los valores de la actividad de la PG en las muestras comerciales de caqui tratadas con 1-MCP fueron aproximadamente un 49.95% inferiores que los de las no tratadas.

En el estudio de Alkan et al. (2023) estudiaron el efecto de 1-MCP sobre la actividad enzimática de la PG en berenjenas. Se observó que la actividad disminuyó significativamente en frutas tratadas con 1-MCP en comparación con muestras control que no recibieron ningún tratamiento. También se comprobó el mayor efecto del 1-MCP sobre la reducción de la actividad enzimática de PG frente a otros métodos de conservación, como el tratamiento térmico en agua caliente y el tratamiento con cloruro de calcio (CaCl_2). Este mismo resultado se observó en el estudio de Win et al. (2021) donde se estudió la actividad de la exo-PG durante el almacenamiento en frío de manzanas, comprobando que aumentó su concentración. Este hecho indica su papel en la degradación de la pectina de la pared celular. Sin embargo, la aplicación de 1-MCP reduce significativamente la actividad de la enzima exo-PG en comparación con las frutas no tratadas, lo que sugiere que el 1-MCP puede retrasar el ablandamiento de la fruta. Efectos similares se han observado en otros frutos como melocotones, albaricoques y nectarinas (Yamada et al., 2012).

Luo (2007) comprobó el efecto de 1-MCP sobre la actividad de la PG en frutos de caqui en condiciones de comercialización. A pesar de que aumentó la actividad debido a la exposición a 20°C , el aumento fue significativamente menor en frutos tratados con 1-MCP frente a los frutos no tratados, tal y como se observa en este trabajo. En trabajos sobre otros frutos como tomates (Mostofi et al., 2003) y aguacates (Jeong et al., 2002) también se ha demostrado este mismo efecto del 1-MCP. Se observó que el pico de PME precedía al pico de PG tanto en caqui control como en caqui tratado con 1-MCP, hecho también observado en melocotones (Zhou et al., 2000). Por ello se considera que el tratamiento con 1-MCP ralentiza la actividad enzimática de PG probablemente como consecuencia de la menor cantidad de sustrato desmetilado por la acción de PME. Se sugiere que la acción de la PME puede ser un requisito previo para la actividad óptima de ambas enzimas, siendo su acción coordinada.

Figura 4. Gráfico de medias e interacciones con intervalos LSD entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad de la enzima PG ($\text{U g}^{-1}\text{FW}$) del caqui comercial.



5. CONCLUSIONES

El tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP), previo a la conservación del caqui a 0°C, tanto durante 60 como 90 d, ralentiza la actividad de las enzimas responsables de la degradación de la pared celular: pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) y aumenta la firmeza del caqui comercial. El tratamiento con 1-MCP no influye en el contenido en taninos solubles, por lo que mantiene el carácter no astringente de los caquis comerciales. El tratamiento con 1-MCP potencia los efectos de la conservación en frío a 0°C prolongando la vida comercial del caqui ‘Rojo Brillante’.

6. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkan, O. N., Önder, D., Önder, S., & Karakurt, Y. (2023). Cell wall composition and enzyme-related activities in eggplant as affected by hot water, 1-MCP and calcium chloride treatments. *Food Science and Technology International*, 29 (6), 665-679. <https://doi.org/10.1177/10820132221132914>
- Amorim, C., Antonioli, L. R., Orsi, B., & Kluge, R. A. (2023). Advances in metabolism and genetic control of astringency in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit: A review. *Scientia Horticulturae*, 308, 111561. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2022.111561>
- Arnal, L., Del Río, M.A. (2003). Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen enriched atmospheres in persimmon fruit cv. ‘Rojo Brillante’. *Journal of Food Science*, 68: 1516–1518.
- Arnal, L., Besada, C., Navarro, P., & Salvador, A. (2008). Effect of controlled atmospheres on maintaining quality of persimmon fruit cv. «Rojo Brillante». *Journal of Food Science*, 73(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00602.x>
- Badenes, M. L., & Byrne, D. H. (Eds.). (2012). *Fruit breeding* (Vol. 8, Capítulo 17). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9>
- Berretta, M., Quagliariello, V., Maurea, N., Di Francia, R., Sharifi, S., Facchini, G., Rinaldi, L., Piezzo, M., Ceccarelli, M., Nunnari, G., & et al. (2020). Multiple effects of ascorbic acid against chronic diseases: Updated evidence from preclinical and clinical studies. *Antioxidants*, 9(12), 1182. <https://doi.org/10.3390/antiox9121182>
- Besada, C., Llorca, E., Novillo, P., Hernando, I., & Salvador, A. (2015). Short-term high CO₂ treatment alleviates chilling injury of persimmon cv. Fuyu by preserving the parenchyma structure. *Food Control*, 51, 163-170. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.11.013>
- 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>
- Bohn, T., Bonet, M. L., Borel, P., Keijer, J., Landrier, J. F., Milisav, I., Ribot, J., Riso, P., Winklhofer-Roob, B., Sharoni, Y., Corte-Real, J., Van Helden, Y., Loizzo, M. R., Poljšak, B., Porrini, M., Roob, J., Trebše, P., Tundis, R., Wawrzyniak, A., Dulińska-Litewka, J. (2021). Mechanistic aspects of carotenoid health benefits - Where are we now? *En Nutrition Research Reviews* (Vol. 34, Número 2, pp. 276-302). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0954422421000147>
- Choudhary, R., Singh, A., Upadhyay, A., Singh, R., Thangalakshmi, S., Dar, A. H., Bajpai, V. K., & Shukla, S. (2023). Exotic god fruit, persimmon (*Diospyros kaki*): Pharmacological importance and human health aspects. *En eFood* (Vol. 4, Número 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/efd2.52>
- Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2010). ORDEN 40/2010, de 17 de noviembre, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida Kaki Ribera del Xúquer y su consejo regulador. DOGV, (6403), [2010/12524]. Ref. Base Datos 012586/2010.

- Díaz, L. D., Dorta, E., Maher, S., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2020). Potential nutrition and health claims in destringed persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.), variety 'Rojo Brillante,' PDO 'Ribera del Xúquer'. *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051397>
- Guan, Z. W., Yu, E. Z., & Feng, Q. (2021). Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota. En *Molecules* (Vol. 26, Número 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26226802>
- Jeong, J., Huber, D. J., & Sargent, S. A. (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(3), 241-256. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00184-3)
- Kaki Persimon®. (2024). Recuperado el 5 de junio de 2024, de <https://persimon.eu/>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111490>
- Luo, Z. (2007). Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of postharvest persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 285-291. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.10.010>
- 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>
- Moreiras, O., Carbajal, Á., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2013). *Tablas de composición de alimentos* (16ª ed. revisada y ampliada). Editorial Pirámide.
- Mostofi, Y., Toivonen, P. M. A., Lessani, H., Babalar, M., & Lu, C. (2003). Effects of 1-methylcyclopropene on ripening of greenhouse tomatoes at three storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 27(3), 285-292. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00113-8)
- 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(3), 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. doi:10.1177/1082013205057941
- Salvador, A., Besada, C., & Crisosto, C. H. (2020). Persimmon. In *Manual on postharvest handling of Mediterranean tree fruits and nuts* (pp. 88-133). <https://doi.org/10.1079/9781789247176.0088>
- Salvador, A., Cuquerella, J., Martínez-Jávega, J. M., Monterde, A., & Navarro, P. (2004). 1-MCP preserves the firmness of stored persimmon «Rojo Brillante». *Journal of Food Science*, 69(2), snq69-snq73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb15516.x>
- Tucker, G., Yin, X., Zhang, A., Wang, M., Zhu, Q., Liu, X., Xie, X., Chen, K., & Grierson, D. (2017). Ethylene. En *Food Quality and Safety* (Vol. 1, Número 4, pp. 253-267). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx024>
- Win, N. M., Yoo, J., Naing, A. H., Kwon, J.-G., & Kang, I.-K. (2021). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) treatment delays modification of cell wall pectin and fruit softening in “Hwangok” and “Picnic” apples during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 180, 111599. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111599>
- Yamada, M., Giordani, E., & Yonemori, K. (2012). Persimmon. En *Fruit Breeding* (pp. 663-693). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_17
- Yang, S., Zhang, M., Xu, L., Zhang, Q., Zhou, C., Hu, X., & Luo, Z. (2023). Recent Advances in Natural

Deastringency and Genetic Improvement of Chinese PCNA Persimmon (*Diospyros kaki*). *En Horticulturae* (Vol. 9, Número 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9121273>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107439>

Zhou, H.-W., Ben-Arie, R., & Lurie, S. (2000). Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry*, 55(3), 191-195. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00271-5)

ANEXOS

Figura 1 material suplementario (FS1). Representación gráfica de la recta de calibrado de la concentración de ácido gálico frente al incremento de la absorbancia para el cálculo de concentración de taninos.

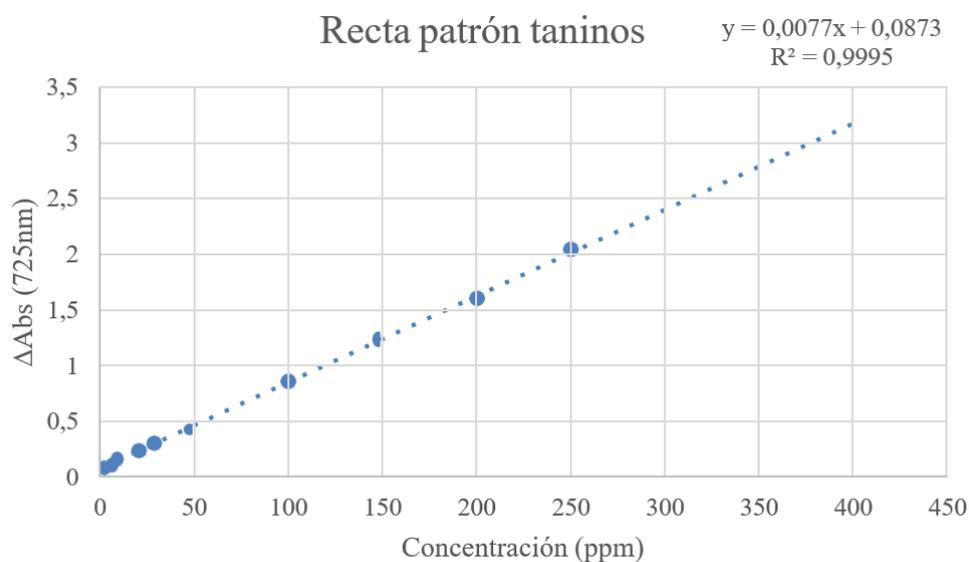


Figura. 2 material suplementario (FS2). Representación gráfica de la recta de calibrado de la concentración de ácido gálico frente al incremento de la absorbancia para el cálculo de concentración de taninos

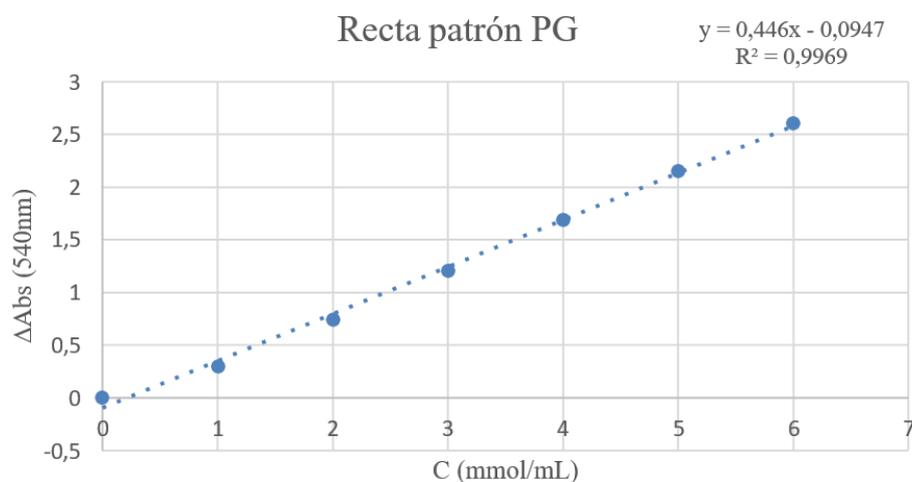


Tabla 2 material suplementario (TS1). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable firmeza (N) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	16412,8	1	16412,8	693,2	0,0000
B: Tiempo F	36,3	1	36,3	1,53	0,2208
INTERACTIONS					
AB	97,2	1	97,2	4,11	0,0475
RESIDUAL	1325,9	56	23,6767		
TOTAL (CORRECTED)	17933,4	59			

Tabla 3 material suplementario (TS2). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable concentración de taninos (ppm) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo F (días)	28,5201	1	28,5201	19,78	0,0001
B: Tratamiento	0,306153	1	0,306153	0,21	0,6485
INTERACCIONES					
AB	4,01153	1	4,01153	2,78	0,1065
RESIDUOS	40,3805	28	1,44216		
TOTAL (CORREGIDO)	73,2183	31			

Tabla 4 material suplementario (TS3). Análisis de la varianza ANOVA simple para el factor tiempo de almacenamiento en frío para la variable concentración de taninos (ppm) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	32,8378	3	10,9459	7,59	0,0007
Intra grupos	40,3805	28	1,44216		
TOTAL (CORREGIDO)	73,2183	31			

Tabla 5 material suplementario (TS4) Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad enzimática de PME (Ug⁻¹FW) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo F (días)	0,00305632	1	0,00305632	0,48	0,4893
B: Tratamiento	0,108044	1	0,108044	16,99	0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,011446	1	0,011446	1,80	0,1819
RESIDUOS	0,890191	140	0,00635851		
TOTAL (CORREGIDO)	1,01274	143			

Tabla 6 material suplementario (TS5). Análisis de la varianza ANOVA simple para el factor tratamiento para la variable actividad enzimática de PME (Ug⁻¹FW) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,122133	3	0,0407109	6,55	0,0004
Intra grupos	0,857462	138	0,00621349		
Total (Corr.)	0,979594	141			

Tabla 7 material suplementario (TS6). Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial entre los factores tratamiento (MCP y NOMCP) y tiempo de almacenamiento a 0°C (Tiempo F; 60 y 90 d) para la variable actividad enzimática de PG (Ug⁻¹FW) en caqui comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo F (días)	25,525	1	25,525	3,23	0,0818

B: Tratamiento	579,382	1	579,382	73,28	0,0000
INTERACCIONES					
AB	125,77	1	125,77	15,91	0,0004
RESIDUOS	253,003	32	7,90633		
TOTAL (CORREGIDO)	983,68	35			