

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	Actividad de la poligalacturonasa y atributos morfoestructurales como indicadores del avance de la senescencia de la papaya (Carica papaya L.) fresca precortada.		
SUBTITULO			
AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Carulla Falla, Juan Manuel		
PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	Expresión génica		atributos morfoestructurales
	actividad enzimática		senescencia
	Poligalacturonasa		Tainung 1
RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>La papaya es una fruta de alta producción y exportación en Colombia, su comercialización se debe al aporte en nutrientes. Sin embargo, su mayor problema de calidad se relaciona con el ablandamiento y la actividad de Poligalacturonasa. Se planteó determinar una posible relación entre los cambios en la actividad enzimática de la Poligalacturonasa, la expresión molecular semicuantitativa de la enzima y los atributos morfoestructurales de las células de papaya como indicadores del avance de la senescencia. Se encontró una relación lineal de expresión génica con actividad enzimática durante el avance de la senescencia. Igualmente se encontró una relación lineal entre factores de tamaño e irregularidad celular con la actividad enzimática y se calculó un modelo aproximativo que describe ese comportamiento.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**ACTIVIDAD DE LA POLIGALACTURONASA Y ATRIBUTOS
MORFOESTRUCTURALES COMO INDICADORES DEL AVANCE
DE LA SENESCENCIA DE LA PAPAYA (*Carica papaya L.*) FRESCA
PRECORTADA**

JUAN MANUEL CARULLA FALLA



**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
ÉNFASIS BIOPROCESOS
Febrero, 2013**

**ACTIVIDAD DE LA POLIGALACTURONASA Y ATRIBUTOS
MORFOESTRUCTURALES COMO INDICADORES DEL AVANCE
DE LA SENESCENCIA DE LA PAPAYA (*Carica papaya L.*) FRESCA
PRECORTADA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN
DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

JUAN MANUEL CARULLA FALLA

**DIRECTOR
GABRIELA CÁEZ RAMÍREZ, MSc.**



**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
ÉNFASIS BIOPROCESOS
Febrero, 2013**

**ACTIVIDAD DE LA POLIGALACTURONASA Y ATRIBUTOS
MORFOESTRUCTURALES COMO INDICADORES DEL AVANCE
DE LA SENESCENCIA DE LA PAPAYA (*Carica papaya L.*) FRESCA
PRECORTADA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER
EN**

DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS

JUAN MANUEL CARULLA FALLA



Nota de aceptación.

Reunida la mesa examinadora se suscribe que la tesis presentada por el estudiante del énfasis de Bioprocesos Juan Manuel Carulla, titulada: “Actividad de la poligalacturonasa y atributos morfoestructurales como indicadores del avance de la senescencia de la papaya (*Carica papaya* L.) Fresca precortada”, que contó con la dirección de Gabriela Cáez MSc, fue evaluada como _____

Nombre Jurado 1

Nombre Jurado 2

Nombre Jurado 3

Bogotá, Febrero de 2013

AGRADECIMIENTOS

A Gabriela Cáez, por brindarme sus conocimientos y por guiarme durante este trabajo.

A Luis Eduardo Díaz, por su apoyo en la parte molecular y de búsqueda de primers.

A Jorge Rodríguez, por su apoyo en el laboratorio.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana por el apoyo a través de la Asistencia Graduada.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo General:.....	17
2.2 Objetivos específicos:.....	17
3. MARCO TEÓRICO.....	19
3.1 Papaya (<i>Carica Papaya L.</i>).....	19
3.2 Maduración y Senescencia de la papaya.....	20
3.3 Pared Celular	22
3.4 Componentes principales de la pared celular vegetal.....	23
3.4.1 Celulosa	23
3.4.2 Hemicelulosa.....	23
3.4.3 Pectinas	23
3.5 Enzimas asociadas a la pérdida de firmeza.....	24
3.6 Características generales de las poligalacturonasas	26
3.7 Análisis de imágenes.....	27
3.7.1 Factores de tamaño	27
3.7.2 Factores de forma	28
4. ESTADO DEL ARTE.....	29
4.1 Correlación de la Poligalacturonasa y la firmeza en frutas.....	29
4.2 Expresión de la poligalacturonasa.....	29
4.3 Análisis de Imágenes.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Material vegetal.....	32
5.2 Caracterización de los estados de madurez	32
5.2.1 Determinación de la tasa respiratoria.....	32
5.2.2 Caracterización Fisicoquímica y Textura.....	33
5.3 Extracción de la Enzima.....	33
5.4 Electroforesis 2D-PAGE	33
5.5 Aislamiento RNA total.....	34
5.6 Conversión de RNA total a DNA complementario.....	35

5.7	Amplificación de los productos cDNA	35
5.8	Determinación de la actividad enzimática	36
5.9	Análisis de imágenes	37
5.10	Análisis estadístico	37
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	38
6.1	Caracterización de los estados de madurez	38
6.2	Electroforesis SDS-Page y 2D-Page.....	39
6.3	Determinación de la expresión de la PG.	43
6.4	Determinación de los parámetros descriptores de la actividad enzimática	44
6.5	Determinación de la actividad enzimática después del corte.....	46
6.6	Expresión Génica y Actividad Enzimática	48
6.7	Cálculo de las características morfoestructurales celulares.....	50
6.8	Relación entre la actividad enzimática específica de la PG y las características morfoestructurales celulares en papaya.	57
6.9	Evaluación estadística de las correlaciones.....	60
6.10	Análisis de factores de forma y tamaño por componentes principales.....	62
6.11	Construcción del modelo.....	65
6.12	Estructura y actividad enzimática	71
	CONCLUSIONES.....	74
	RECOMENDACIONES.....	77
	REFERENCIAS	78
	ANEXOS	84

LISTA DE FIGURASY TABLAS

Lista de Figuras

Figura 1: Consumo per cápita de frutas y vegetales 1961-2003(Fischer, 2009).	13
Figura 2: Composición nutritiva de papaya (<i>Carica papaya L.</i>), 100g de tejido comestible sin semillas ni cáscara, de acuerdo a la Food and Agricultural Organization (FAO).....	14
Figura 3: Estados de maduración de la papaya. Los números superiores indican el grado de madurez por color y los inferiores el porcentaje de amarillamiento de la fruta (ICONTEC, 1993).....	20
Figura 4. Esquema de los principales componentes de la pared celular. Adaptado (N. C. Carpita & Gibeaut, 1993).....	22
Figura 5. Ilustración de la determinación de la tasa respiratoria, adaptado (Carmona, Aguilera, Pérez, & Serey, 2006).....	32
Figura 6. Firmeza de papaya y SST frente al avance de la madurez. Los números inferiores indican los estados de madurez (1-6).....	38
Figura 7. Relación entre la tasa respiratoria y el avance en la madurez. Los números inferiores indican los estados de madurez (1-6).....	39
Figura 8. Electroforesis SDS Page. MPM: Marcador de Peso Molecular de proteína. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: PG a diferentes minutos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 de exposición después del corte de 5mm respectivamente.	40
Figura 9. SDS-Page de purificación de PME de Extracto de papaína comercial. Fuente: Vasu, 2012.....	40
Figura 10. Electroforesis 2DE-PAGE de extractos de Papaya Tainung. Los puntos negros indican el marcador de peso molecular. Los puntos 1 y 2 indican las proteínas de interés.	41
Figura 11. 2D-DIGE mapa de papaya. Fuente: Nogueira, 2012.	42
Figura 12. RT-PCR del Gen HouseKeeping 18S rRNA.MPM: Marcador de Peso Molecular. Carril 1: Réplica 1 a las 0 horas. Carril 2: Réplica 2 a las 0 horas. Carril 3: Réplica 1 a las 2 horas. Carril 4: Réplica 2 a las 2 horas. Carril 5: Réplica 1 a las 4 horas.....	43
Figura 13. RT-PCR del Gen de Poligalacturonasa. MPM: Marcador de Peso Molecular. Carril 1: Réplica 1 a las 0 horas. Carril 2: Réplica 2 a las 0 horas. Carril 3: Réplica 1 a las 2 horas. Carril 4: Réplica 2 a las 2 horas. Carril 5: Réplica 1 a las 4 horas.	44
Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PG. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).	45
Figura 15. Linealización Lineweaver-Burk.....	45
Figura 16. Comportamiento de la actividad enzimática específica durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante	

un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	47
Figura 17. Relación entre la Expresión y Actividad Enzimática específica de la Poligalacturonasa durante su exposición a 18°C y 55%HR. El eje de las ordenadas se encuentra dispuesto en escala logarítmica sin generar un cambio en las magnitudes trabajadas.....	49
Figura 18. Fotos de los cortes con micrótopo de 30 μm observados en un microscopio con objetivo 10x en contraste de fases. a) 0 minutos de exposición. b) 30 minutos de exposición. c) 60 minutos de exposición. d) 90 minutos de exposición. e) 120 minutos de exposición. f) 150 minutos de exposición. g) 180 minutos de exposición. h) 210 minutos de exposición. i) 240 minutos de exposición.....	51
Figura 19. Comportamiento del área celular durante su exposición a 18 \pm 2°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	52
Figura 20. Comportamiento del perímetro celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	53
Figura 21. Comportamiento del Diámetro de Ferret celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	53
Figura 22. Comportamiento del factor A/P celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	54
Figura 23. Comportamiento de la redondez celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), no se mostraron diferencias significativas.	55
Figura 24. Comportamiento de la Proporción de Aspecto celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), no se mostraron diferencias significativas.	55
Figura 25. Comportamiento de la circularidad celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	56
Figura 26. Comportamiento de la solidez celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).....	56
Figura 27. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el área celular.....	57
Figura 28. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el perímetro celular.....	58
Figura 29. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el factor A/P celular.	58

Figura 30. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el Diámetro de Feret celular.....	59
Figura 31. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el Diámetro de Feret celular.....	59
Figura 32. Gráfica de Componentes Principales.....	64
Figura 33. Dispersión de los datos de Componentes Principales	65
Figura 34. Gráfica de Componentes Principales del modelo.....	67
Figura 35. Modelo preliminar calculado.....	68
Figura 36. Modelo final calculado	70
Figura 37. Ajuste del modelo final.....	70
Figura 38. Resumen del diagnóstico de ajuste para el modelo final.....	71
Figura 39. Pérdida de firmeza de las frutas debido a diversos cambios en la pared celular. (Hodges & Toivonen, 2008).....	72

Lista de Tablas

Tabla 1. Mecanismos de acción de enzimas involucradas en la pérdida de la firmeza.....	25
Tabla 2. Coeficientes de determinación y correlación hallados en las relaciones actividad enzimática específica vs característica morfoestructural.....	60
Tabla 3. ANOVA general.....	61
Tabla 4. ANOVA características morfoestructurales y de réplicas.....	61
Tabla 5. Análisis suma de cuadrados tipo III para las características morfoestructurales.....	62
Tabla 6. Matriz de correlación de componentes principales.	62
Tabla 7. Matriz de los valores relativos de incidencia de las agrupaciones en la variabilidad total.....	63
Tabla 8. Tabla de pesos de los componentes principales.....	63
Tabla 9. Matriz de correlación del modelo.	65
Tabla 10. Matriz de los valores relativos de incidencia de las agrupaciones en la variabilidad total del modelo.	66
Tabla 11. Tabla de pesos de componentes principales del modelo.	66

RESUMEN

La papaya es una fruta de alta producción y exportación en Colombia. La posibilidad de comercialización de la papaya fresca precortada es interesante debido a su aporte en nutrientes. Sin embargo, su mayor problema de calidad se relaciona con el ablandamiento y la actividad de la Poligalacturonasa. Se planteó determinar una posible relación entre los cambios en la actividad enzimática de la Poligalacturonasa, la expresión molecular semicuantitativa de la enzima y los atributos morfoestructurales de las células de papaya (*Carica papaya L.*) variedad Tainung 1 como indicadores del avance de la senescencia. Para ello, se determinó el estado de madurez apropiado para el seguimiento de la actividad enzimática, se estableció la presencia de una endopoligalacturonasa, se efectuó su identificación preliminar, se evaluó la afinidad y actividad enzimática de la Poligalacturonasa presente en el extracto proteico de la papaya del estado de madurez máximo, el avance de la senescencia por efecto de exposición al ambiente de la fruta precortada sobre la actividad y la expresión génica semicuantitativa. Empleando técnicas de proteómica y genómica se evaluó la expresión de la enzima. A partir de los resultados se encontró una relación lineal de la expresión génica con la actividad enzimática durante el avance de la senescencia. Igualmente se encontró una relación lineal entre los factores de tamaño e irregularidad celular con la actividad enzimática y se calculó un modelo aproximativo que describe ese comportamiento. La combinación de una observación multinivel evaluando cambios de actividad enzimática, en la expresión génica y los parámetros morfoestructurales celulares permitió evidenciar que los cambios a nivel molecular se reflejan en el incremento de la actividad enzimática que produce cambios morfogeométricos de las células de papaya fresca precortada, todos estos fenómenos vinculados al proceso de senescencia.

ABSTRACT

Papaya is a fruit of high production and exportation in Colombia. The possibility of papaya fresh cut marketing is interesting due to its nutrient supply. However, its biggest quality problem is related to fruit softening and polygalacturonase activity. Therefore, the aim of this study was to establish a possible relationship between changes in the polygalacturonase enzymatic activity, semiquantitative molecular expression of the enzyme and cell morphometric attributes of papaya (*Carica papaya L.*) Tainung 1 as indicators of the progress of senescence. Thus, appropriate ripening stage was determined to assess enzymatic activity, the presence of an endopolygalacturonase was established with a preliminary identification, affinity and enzymatic activity of polygalacturonase in the proteic extract was evaluated at maximum ripening stage, the effect of the progress of senescence due to environmental exposure of fresh cut fruit on enzymatic activity and gene expression was determined.

Proteomic and genomic techniques were used to evaluate the expression of the enzyme. A lineal relationship between gene expression and enzymatic activity during the progress of senescence was found. Likewise, a lineal relationship between size and irregular attributes with the enzymatic activity was found and an approximate model that describes its behavior was calculated. Combination of observation at multilevel and evaluation of changes in enzymatic activity, gene expression and morphometric attributes allowed to evidence that changes at molecular level are reflected in the increase of enzymatic activity, which causes cellular morphometric changes of fresh cut papaya, all these phenomena related to senescence process.

INTRODUCCIÓN

El consumo mundial per cápita de frutas ha crecido en las últimas décadas, tal como lo informa la figura 1. De acuerdo con la información consultada, el mercado de las frutas frescas precortadas crece más de 4% al año en promedio desde 1961, con los datos mostrados se puede concluir que la tendencia del consumo de frutas se encuentra en alza, probamente por las últimas tendencias mundiales de la alimentación y consumo sano.

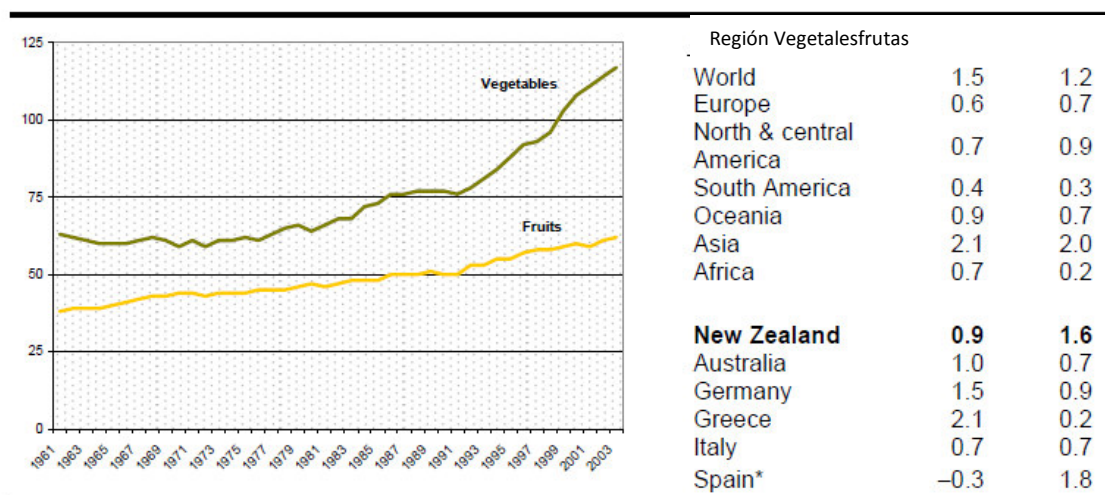


Figura 1: Consumo per cápita de frutas y vegetales 1961-2003(Fischer, 2009).

La papaya (*Carica papaya L.*) ha tenido una alta demanda a nivel mundial debido a su alto contenido de vitaminas y antioxidantes, y por su efecto favorable a la digestión y asimilación de los alimentos (Alonso Esquivel, Tornet, Aranguren, Ramos, Rodríguez, & Pastor, 2008). A continuación (Figura 2), se informa la cantidad de nutrientes que contiene la papaya haciéndola una fuente importante de vitaminas:

Nombre corto:	Papaya*				
Agua (g)	90.00	Ácidos grasos saturados (g)		Hierro (mg)	0.40
Proteínas (g)	0.50	Ácidos grasos monoinsaturados (g)		Zinc (mg)	
Grasas (g)	0.10	Ácidos grasos poliinsaturados (g)		Vitamina A equiv. totales (µg)	210.00
Cenizas (g)	0.50	Colesterol (mg)		β-caroteno equiv. totales (µg)	
Fibra dietética (g)		Sodio (mg)		Tiamina (mg)	0.03
Carbohidratos totales (g)	8.90	Potasio (mg)		Riboflavina (mg)	0.02
Carbohidratos disponibles (g)		Calcio (mg)	25.00	Niacina (mg)	0.30
Energía (kcal)		Energía (kj)		Fósforo (mg)	12.00
Vitamina C (mg)	75.00				

*Descripción de alimento código C429, papaya de Colombia no reporta variedad.

Figura 2: Composición nutritiva de papaya (*Carica papaya L.*), 100g de tejido comestible sin semillas ni cáscara, de acuerdo a la Food and Agricultural Organization (FAO)

De acuerdo con las estadísticas de la Food and Agricultural Organization (FAO), Colombia en el 2008 se ubicó en el puesto número ocho de producción de papaya a nivel mundial con 207 698 toneladas, el tercero de América Latina después de Brasil y México. Colombia es el tercer país de exportación de papaya en Sudamérica, después de Brasil y Ecuador.

Una vez establecidos los datos de producción, consumo, e importancia de la papaya como fuente de nutrientes, se ve la necesidad de poder brindar un producto de calidad, que sea competitivo a nivel mundial. Uno de los factores más significativos para la calidad de la papaya es la textura. El ablandamiento es producto del avance del envejecimiento o senescencia, mismo que implica cambios en la calidad del material.

En la actualidad los métodos para determinar el ablandamiento de las frutas son destructivos, de tal manera que si se quisiera evaluar en una línea de producción se tendrían desventajas en términos de daño de las unidades evaluadas, incremento en el seguimiento del tiempo, y por ende competitividad.

Diversos autores (Zainon Mohd Ali, Chin, & Lazan, 2004; Brummel & Harpster, 2001; Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009), involucran a las hidrolasas como responsables del ablandamiento ya sea como respuesta a una condición de estrés o por el proceso de maduración. Se mencionan mayoritariamente las celulasas, xilanasas, β -galactosidasas, glucanasas, pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (Brummel & Harpster, 2001). La actividad de la Poligalacturonasa (PG) se encuentra asociada al proceso de maduración conjuntamente con otras enzimas, especialmente la PME (Flanzy, 2002). Sin embargo se ha estudiado poco la actividad de esta enzima y su relación con los cambios celulares observables a través de atributos morfoestructurales en papaya fresca precortada.

Se espera entonces establecer una posible relación entre cambios enzimáticos y variaciones en la estructura reflejadas a través de análisis de imágenes. Esta estrategia podría ser un primer paso para evaluar alternativas sistémicas, basadas en relaciones, focalizadas a la minimización de las causas del ablandamiento durante el almacenamiento de la papaya fresca precortada, permitiendo el incremento de su vida útil y una mayor posibilidad de comercialización.

Esta investigación está vinculada al Proyecto general Aprobado en la convocatoria de menor cuantía 20101 y patrocinado por el fondo patrimonial especial de la Universidad de La Sabana, titulado: Relación entre cambios morfoestructurales, enzimáticos y de componentes bioactivos de papaya fresca precortada a través de análisis de imágenes.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

En el contexto del problema planteado se busca responder para la papaya fresca precortada:

- ¿Se puede establecer una relación entre la actividad enzimática de la Poligalacturonasa con los atributos morfoestructurales celulares de la papaya (*Carica papaya L.*) en función del avance de la senescencia?

Hipótesis: Existe una relación entre la actividad enzimática de la Poligalacturonasa con los atributos morfoestructurales celulares de la papaya (Carica papaya L.) en función del avance de la senescencia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

- Determinar una posible relación entre los cambios en la actividad enzimática de la Poligalacturonasa, la expresión molecular semicuantitativa de la enzima y los atributos morfoestructurales de las células de papaya (*Carica papaya L.*) variedad Tainung 1 como indicadores del avance de la senescencia.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar el estado de madurez apropiado para el seguimiento de la actividad enzimática de hidrolasas de pectina a partir de la evaluación de sólidos solubles totales, tasa respiratoria y firmeza de la papaya (*Carica papaya L.*) variedad Tainung 1.
- Establecer la presencia de una posible polygalacturonasa a través de electroforesis del extracto proteico, e identificación preliminar de mRNA por amplificación con primers específicos y la técnica reacción en cadena da la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR).
- Evaluar la afinidad y actividad enzimática de la Poligalacturonasa presente en el extracto proteico de la papaya del estado de madurez seleccionado y el avance de la senescencia por efecto de exposición al ambiente de la fruta precortada sobre la actividad y la expresión semicuantitativa (RT-PCR) de Poligalacturosasa.

- Establecer el avance de la senescencia en la papaya precortada a partir de la posible relación entre la actividad enzimática de la Poligalacturonasa y algunas características morfoestructurales de las células de papaya: circularidad, proporción de radio, solidez, diámetro Ferret, perímetro y área, a través de análisis de imágenes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Papaya (*Carica Papaya L.*)

La papaya es una planta originaria de América Latina y se ha introducido en países de clima cálido del mundo; es un cultivo de gran interés tanto por su rapidez de crecimiento como por la riqueza vitamínica de sus frutos (Arango, Román, Salamanca, Almansa, Bernal, León, et al., 2000; FAO, 2002). Esta fruta es una buena fuente de Ca⁺⁺, tiene alto contenido de vitamina A, B1, B2 y C y contiene aproximadamente el 5% de proteína (de Oliveira & Vitória, 2011).

Es una planta herbácea, posee un solo tronco que puede ramificarse hasta alcanzar de 8 a 10 metros; es polígama, es decir que se pueden encontrar tallos con flores masculinas, femeninas o hermafroditas (FAO, 2002; Morales & Box, 2005).

En Colombia la mayor producción de papayas se dan en la variedad Maradol, y los híbridos Tainung 1 y Tainung, de alta producción en el Valle del Cauca. Para este estudio se seleccionó el híbrido Tainung 1 de mayor producción en el Valle del Cauca por su proyección para exportación (Reyes, Mesa, Reyes, Negrette, & Muñoz, 2006).

El híbrido Tainung 1 es de origen Taiwanés (Gil & Miranda, 2005). Las plantas presentan portes cercanos a los 3m de altura y en su mayoría son hermafroditas. Este tipo de híbrido produce un número alto de hojas y debido a este fenómeno tiene una mayor productividad comparada el híbrido Scarlett Princess y la variedad Maradol; en el fruto predomina el color rojizo - anaranjado en la pulpa de los frutos y la forma ligeramente estrellada en la cavidad interna (Alonso Esquivel, Tornet, Ramos, Farrés, & Rodríguez, 2009).

Existe preferencia por las plantas de papaya hermafroditas con frutos de formato periforme o alargado, asociado a una menor cavidad ovariana y un mayor espesor de

pulpa (Marin, Pereira, Amaral Júnior, Martelleto, & Ide, 2006), lo que le confiere al híbrido Tainung 1 un mayor valor comercial.

3.2 Maduración y Senescencia de la papaya

La papaya es una fruta climatérica, es decir produce gran cantidad de etileno y su maduración es promovida por el mismo al actuar como hormona (Hodges & Toivonen, 2008). La maduración de la papaya ocurre tanto en el interior como en el exterior del fruto. Los estados se clasifican de 0 a 6 por color superficial del fruto y cada estado representa un porcentaje de maduración (figura 3).

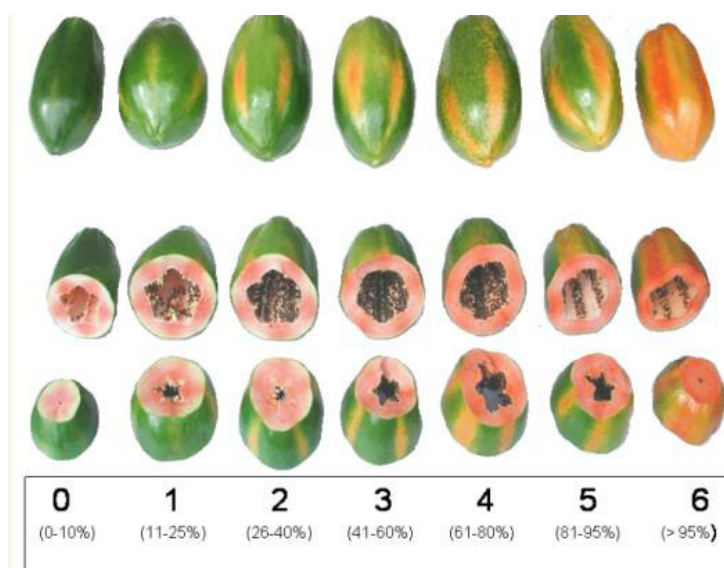


Figura 3: Estados de maduración de la papaya. Los números superiores indican el grado de madurez por color y los inferiores el porcentaje de amarillamiento de la fruta (ICONTEC, 1993)

Durante la maduración y ablandamiento de las frutas, los polisacáridos de la pared celular son modificados por diversas enzimas que actúan en el espacio de la pared

celular y la lámina media. Estos cambios afectan la estructura y fortaleza de la pared, generando una pérdida de firmeza en la fruta (Hodges & Toivonen, 2008). Las reacciones asociadas con estos cambios incluyen cambios en la estructura de los polímeros, cambio en la composición de la pared celular y lámina media y finalmente la disrupción celular.

La acelerada desestructuración de la pared celular y el aumento del ablandamiento en frutas frescas precortadas se deben, en su mayoría, a un incremento de la actividad hidrolasa en la pared celular (Hodges & Toivonen, 2008). En comparación con fruta intacta, se ha observado que el contenido de pectina de papaya fresca precortada disminuye, aumenta su solubilización y presenta depolimerización al mismo tiempo que se incrementa la actividad de la Poligalacturonasa (Karakurt & Huber, 2003). Este fenómeno es intenso en la superficie de corte, pues compromete la integridad del tejido. La depolimerización de la pectina puede exceder la actividad presentada normalmente, debido a una mayor accesibilidad de sustrato por parte de la Poligalacturonasa o por condiciones iónicas más favorables para la actividad de la enzima (Hodges & Toivonen, 2008). Estos cambios en la pared celular han sido relacionados con la pérdida de la firmeza, lo que indica fallas en la lámina media y el comienzo de colapso celular o senescencia (Brummell, Dal Cin, Crisosto, & Labavitch, 2004) .

La pérdida de firmeza en papaya fresca precortada es un factor limitante de vida útil, incluso en refrigeración dos días después este parámetro puede llegar a ser inaceptable (O'Connor-Shaw, Roberts, Ford, & Nottingham, 2006). A una temperatura 5°C y dos días de almacenamiento, se ha demostrado que la firmeza de papaya fresca precortada variedad Solo declina un 36%, con una tendencia descendente; contrario a la fruta fresca precortada, la papaya intacta puede mantener su firmeza después de 4 días de almacenamiento a 5°C (Karakurt & Huber, 2003).

Para este trabajo se considera senescencia a los cambios debidos al envejecimiento del tejido producto de la exposición de la fruta fresca precortada en el tiempo. Por lo tanto se evalúa la diferencia sustancial del tejido no empacado ni almacenado en condición de frío frente a su condición inmediatamente después del pelado y corte de la fruta. El tiempo de evaluación se limitará al máximo aceptado para exposición en un sistema de venta para fruta precortada, que corresponde a máximo 4 horas (HITM, 2006; USDA, 2013)

3.3 Pared Celular

La pared celular es una red de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de hemicelulosa (figura 4). Los espacios de estas redes son llenados con pectinas, formando también una red (Brummel & Harpster, 2001).

La pared celular es aproximadamente 30% celulosa, 30% hemicelulosa, 35% pectina y 5% proteína en plantas dicotiledóneas (Fry, 1988). El contenido de pectina es más alto y el contenido de proteína es más bajo en la pared celular de las frutas (Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009).

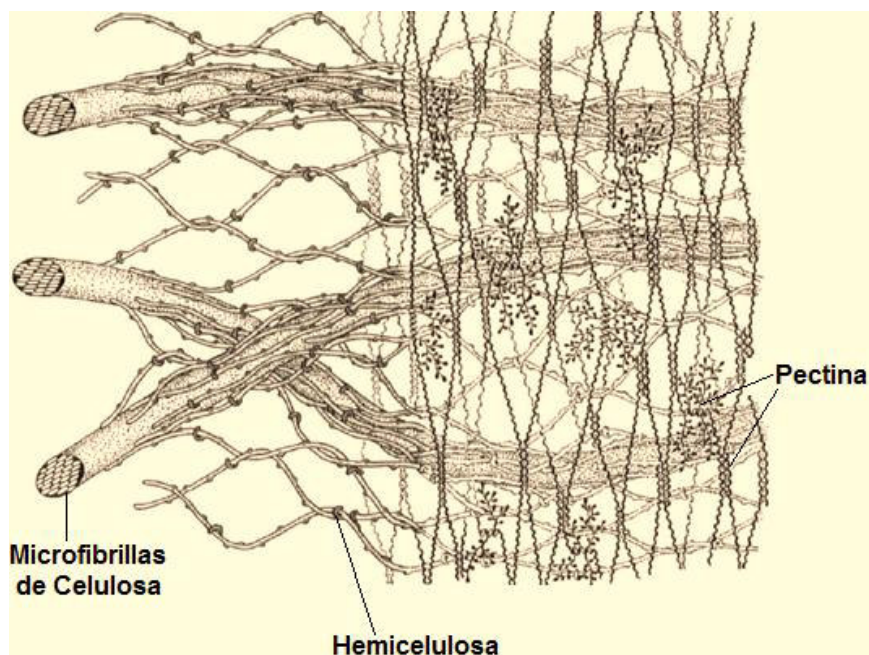


Figura 4. Esquema de los principales componentes de la pared celular. Adaptado (N. C. Carpita & Gibeaut, 1993)

3.4 Componentes principales de la pared celular vegetal

3.4.1 Celulosa

La celulosa es un polímero lineal formado por residuos de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos β -(1→4). Estos glucanos lineales se asocian entre sí mediante enlaces por puente de hidrógeno para formar microfibrillas de al menos 36 cadenas de glucano. La celulosa otorga resistencia mecánica a la pared celular vegetal (N.C. Carpita, 1987).

3.4.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es originalmente definida como la fracción de la matriz la pared celular que puede extraerse con una base fuerte, lo cual incluye a una gran variedad de polisacáridos. Sin embargo, la celulosa se compone en su mayoría de dos tipos de polímeros: Xiloglucanos y xilanos. Xiloglucano es el componente mayoritario, consiste en un polímero de glucosas unidas por enlaces β -(1→4) con ramificaciones de α D-(1→6) Xilosa en tres unidades de glucosa consecutivas, que también puede contener otros azúcares como arabinosa y fucosa. Los xilanos son más complejos y son polímeros que se componen de unidades β -(1→4) Xilosas con ramificaciones de azúcares como la arabinosa y otros derivados. Estos polímeros no son tan largos como la celulosa, pero pueden formar puentes de hidrógeno con esta en diferentes microfibrillas. Los enlaces de la hemicelulosa con la celulosa le dan cierta flexibilidad a la pared celular evitando la agregación de las fibrillas de la celulosa (Gleason & Chollet, 2011).

3.4.3 Pectinas

Las pectinas son el componente principal de la pared celular primaria y la lámina media, contribuyendo a la textura y calidad de las frutas. Estructuralmente, las pectinas son un grupo de heteropolisacáridos que contienen residuos de ácido D-galacturónico parcialmente metilados y cadenas laterales de diferentes polisacáridos

neutros. El ácido galacturónico se encuentra estructurado por dos fracciones: cadenas lineales de Homogalacturonanos y ramificaciones de Ramnogalacturonanos (Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009). El grado de polimerización/esterificación y la proporción de residuos de azúcares neutrales en las cadenas laterales son los factores principales que contribuyen a su heterogeneidad (Prasanna, Prabha, & Tharanathan, 2007).

3.5 Enzimas asociadas a la pérdida de firmeza

Uno de los factores más importantes relacionados con el deterioro de las frutas es la pérdida de firmeza, lo cual implica una vida útil más corta durante el almacenamiento, transporte y distribución (Bouzayen, Latché, Nath, & Pech, 2010). La pérdida de firmeza ocurre muy rápidamente en la papaya, dependiendo de la variedad y el estado de madurez de la fruta esta caída puede darse en uno o dos días (Fabi, Lajolo, & Nascimento, 2009; Fabi, Mendes, Lajolo, & do Nascimento, 2010; Fuggate, Wongs-Aree, Noichinda, & Kanlayanarat, 2010). El ablandamiento se debe principalmente a cambios estructurales en la pared celular (Fry, 1988; Seymour, Colquhoun, Dupont, & Parsley, 1990). Durante este ablandamiento existe una solubilización y una depolimerización de la pectina y hemicelulosa, lo que contribuye a la pérdida y desintegración de la pared celular (Hodges & Toivonen, 2008; Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009).

Además de la solubilización y depolimerización pueden ocurrir también rearrreglos de las diferentes asociaciones (Redgwell, Fischer, Kendal, & MacRae, 1997; Rose, Hadfield, Labavitch, & Bennett, 1998). En papaya se ha encontrado que el total de azúcares se incrementa mientras que el peso molecular promedio de los polímeros decrece (fracción soluble KOH) durante la madurez, indicando una hidrólisis de la pectina (Robert E. Paull, Gross, & Qiu, 1999; Sañudo Barajas, Siller Cepeda, Osuna Enciso, Muy Rangel, López Álvarez, Osuna Castro, et al., 2008).

La actividad de algunas enzimas ha sido correlacionada positivamente con la pérdida de firmeza en frutas, siendo las enzimas más importantes involucradas en los cambios de la pared celular: Celulasa, Pectin Metil Esterasa (PME), Poligalacturonasa (PG), β -Galactosidasa y Pectina Liasa (PL) (tabla 1) (Goulao & Oliveira, 2008; Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009; Van Buggenhout, Sila, Duvetter, Van Loey, & Hendrickx, 2009).

Tabla 1. Mecanismos de acción de enzimas involucradas en la pérdida de la firmeza.

Enzima	Mecanismo de Acción	Relación con la firmeza	Referencias
Celulasa	Hidroliza enlaces β -1,4 en celulosa y xilosa	+	(Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009)
Pectin Metil Esterasa	Elimina los grupos metilo de la pectina esterificada	+	(Van Buggenhout, Sila, Duvetter, Van Loey, & Hendrickx, 2009)
Poligalacturonasa	Genera ruptura del enlace β -1,4 glicosídico del ácido péctico	+	(Rodríguez Castro, Narvaez Cuenca, & Restrepo Sanchez, 2006)
β -Galactosidasa	Elimina el residuo terminal no reductor β -Dgalactosil del β -D-galactósido	+	(Zainon Mohd Ali, Chin, & Lazan, 2004; Karakurt & Huber, 2003; Payasi, Mishra, Chaves, & Singh, 2009)
Pectina Lyasa	Cataliza la ruptura de la pectina desesterificada.	+	(Marín-Rodríguez, Orchard, & Seymour, 2002)

En papaya, entre las enzimas más importantes asociadas a cambios en la pared celular se encuentran PME, PG, y β -Galactosidasa (Karakurt & Huber, 2003; Lazan, Selamat, & Ali, 1995). La PME tiene una alta actividad que se incrementa a partir del 25% de madurez (Thumdee, Manenoi, Chen, & Paull, 2010). Además, se han encontrado diferencias significativas entre la actividad de la PME de papayas inmaduras y maduras (Zainon Mohd Ali, Chin, & Lazan, 2004; Karakurt & Huber, 2003; Vasu, Savary, & Cameron, 2012), asociando esta actividad a la solubilización de la pectina de la pared celular (Lazan, Selamat, & Ali, 1995).

En cuanto a la PG, su actividad se ha asociado positivamente con la depolimerización de la pectina de la pared celular, encontrando mayor actividad en papaya fresca

precortada comparada con una menor actividad en fruta intacta (Karakurt & Huber, 2003). También se ha encontrado que la actividad en papayas inmaduras se incrementa un 300% cuando maduran (Zainon Mohd Ali, Chin, & Lazan, 2004).

La β -Galactosidasa al parecer tiene un rol importante en la pérdida de firmeza durante la madurez de la papaya y se ha encontrado una correlación de su actividad con las modificaciones en la pectina y hemicelulosa de la pared celular (Lazan, Selamat, & Ali, 1995); su actividad se incrementa un 250% de papayas inmaduras a completamente maduras (Zainon Mohd Ali, Chin, & Lazan, 2004).

3.6 Características generales de las poligalacturonasas

La poligalacturonasa es una glicohidrolasa que cataliza la hidrólisis de las uniones α -(1 \rightarrow 4) del ácido galacturónico, pueden tener acción exo o endo. Las exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67) remueven unidades simples de ácido galacturónico a partir del extremo no reductor del ácido poligalacturónico. En cambio, las endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15) rompen dicho polímero en posiciones internas al azar (Brummell, Harpster, Civello, Palys, Bennett, & Dunsmuir, 1999; Flanzky, 2002; García, Balbín, Cabrera, & Castelvi, 2002).

Las poligalacturonasas son producidas por una amplia variedad de organismos como hongos, bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos nemátodos parásitos de plantas; tal es el caso de las endopoligalacturonasas. Por su parte, las exopoligalacturonasas se presentan en diferentes frutas y vegetales, y pueden ser producidas por algunos hongos y bacterias (Alkorta, Garbisu, Llama, & Serra, 1998).

Se ha determinado que las PGs muestran una mayor afinidad por la forma de-esterificada de las pectinas, por lo tanto estas últimas serían primeramente de-

metiladas por acción de la PME, como requisito para la acción de las PGs (Brummell, Harpster, Civello, Palys, Bennett, & Dunsmuir, 1999; Flanzy, 2002) .

3.7 Análisis de imágenes

El análisis de atributos morfogeométricos incluye la evaluación de factores de tamaño y de forma, ambos relacionados con la definición de un objeto asimilado como una esfera.

3.7.1 Factores de tamaño

Área: Cálculo de la superficie de cada célula en μm^2 (Arenas-Ocampo, et al., 2012).

Perímetro: Longitud del límite exterior de cada célula en μm (Arenas-Ocampo, et al., 2012).

Factor área/perímetro: El cociente entre el área proyectada y el perímetro del objeto, en μm (Arenas-Ocampo, et al., 2012).

$$\frac{A}{P} = \frac{\text{área}}{\text{perímetro}} \quad (1)$$

Diámetro de Feret: La distancia más larga (μm) calculada entre dos puntos cualesquiera a lo largo del perímetro de cada célula. Las coordenadas de ubicación del punto donde inicia el cálculo de este diámetro están dadas por Feretx y Ferety, mientras que el ángulo se representa por el FeretAngle. La distancia mínima (μm) calculada entre dos puntos cualesquiera a lo largo del perímetro de cada célula está dada por FeretMin (Arenas-Ocampo, et al., 2012).

3.7.2 Factores de forma

Circularidad: Un valor de circularidad de 1.0 representa un círculo perfecto. Valores cercanos a 0.0 indican un polígono alargado (Yang, Kpalma, & Ronsin, 2008).

$$Circularidad = 4\pi \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \quad (2)$$

Redondez: Se define mediante la siguiente ecuación (de Assis Zampirolli, Stransky, Lorena, & de Melo Paulon, 2010):

$$Redondez = 4 \frac{\text{Área}}{\pi \text{ longitud eje mayor}^2} \quad (3)$$

Proporción de Aspecto (AR) o Elongación: Proporción de medida de las células en las dos dimensiones (Yang, Kpalma, & Ronsin, 2008).

$$AR = \frac{\text{longitud eje mayor}}{\text{longitud eje menor}} \quad (4)$$

Solidez: Es el cociente entre el área y el área convexa de las células (Yang, Kpalma, & Ronsin, 2008).

$$Solidez = \frac{\text{área}}{\text{área convexa}} \quad (5)$$

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 Correlación de la Poligalacturonasa y la firmeza en frutas.

Varios estudios se han realizado sobre la correlación de la Poligalacturonasa y la maduración en frutos, especialmente en tomate. Se ha correlacionado la actividad de la PG con el ablandamiento de esta fruta. Los extractos crudos de enzima de tomate son capaces de degradar sustratos de pectina purificados (Hobson, 1965). En frutos de banana, se detectó un incremento en la actividad y expresión de la poligalacturonasa durante la maduración y la senescencia de los frutos (Asif & Nath, 2005). En el caso de melón, se sugirió que la expresión de la poligalacturonasa podría estar asociada con el desensamble de pectinas asociado con la maduración (Hadfield & Bennett, 1998). En papaya también se ha encontrado una relación entre la PG y la pérdida de firmeza de la misma (Fabi, Lajolo, & Nascimento, 2009; Robert. E. Paull & Chen, 1983).

4.2 Expresión de la poligalacturonasa

La expresión de la PG ha sido estudiada por varios autores en diferentes frutas. En un estudio se compararon manzanas transgénicas que diferían simplemente en la expresión de un gen, demostrando los efectos de la PG1 en el metabolismo de la pared celular durante la maduración y confirmando el papel fundamental que tiene esta enzima en los cambios de textura y el ablandamiento de las manzanas, en parte gracias al desensamble de la pared celular y la pérdida de adhesión intracelular (Atkinson, Sutherland, Johnston, Gunaseelan, Hallett, Mitra, et al., 2012). En otro estudio utilizaron técnicas moleculares para identificar tres genes diferentes que se expresan abundantemente durante la maduración del melón, soportando un rol de la PG en la depolimerización de la pectina (Hadfield, Rose, Yaver, Berka, & Bennett, 1998). De igual forma la metodología para la evaluación de la expresión de la PG ha sido estudiada en bananas calentadas con agua caliente y se demostró un incremento

de la expresión de los genes de esta enzima a lo largo de ocho días de almacenamiento durante su maduración (Amnuaysin, Jones, & Seraypheap, 2012). La maduración de tres variedades diferentes de frutilla, dos con tejidos firmes (Selva y Camarosa) y una de tejido suave (Toyonaka) fue estudiada, mostrando una correlación de la expresión y la actividad del gen de PG en la fresa de variedad Toyonaka durante su maduración, pero no se encontró ninguna correlación en las variedades más firmes (Villarreal, Rosli, Martínez, & Civallo, 2008).

4.3 Análisis de Imágenes

Entre las técnicas convencionales para el seguimiento de la calidad de las frutas, el análisis de imágenes surge en los últimos años como una alternativa en la industria debido a los bajos costos y disponibilidad de sensores digitales de imágenes (Facco, Masiero, Bezzo, Barolo, & Beghi, 2011).

Uno de los factores principales que determina la calidad de las frutas en el mercado es el tamaño, que puede definirse con parámetros como volumen, peso y diámetro (Moreda, Ortiz-Cañavate, García-Ramos, & Ruiz-Altisen, 2009). Aunque este factor es tridimensional, el análisis de imágenes para el seguimiento de la calidad en frutas queda reducido a dos dimensiones, siendo el principal parámetro en este tipo de control el área (Jahns, Møller Nielsen, & Paul, 2001; Sadrnia, Rajabipour, Jafary, Javadi, & Mostofi, 2007; Zheng, Sun, & Zheng, 2006). En papaya, se ha encontrado que determinando el peso y el volumen por este método de seguimiento se puede llegar a tener una clasificación correcta de la fruta del 90% (Riyadi, Mustafa, Hussain, & Hamzah, 2007).

El contenido de humedad afecta directamente la calidad de la fruta e influencia directamente en la vida útil de la misma, por ello esta técnica de análisis de imágenes también ha sido aplicada para estimar el contenido de humedad en manzanas,

teniendo una correlación cercana al $R^2= 0,73$ (Vesali, Gharibkhani, & Komarizadeh, 2011).

Los defectos externos de la fruta son otro factor de clasificación que se usa en postcosecha y el análisis de imágenes puede llegar a ser muy útil. Se ha utilizado el análisis de imágenes multivariado para identificar defectos en la piel de frutas cítricas obteniendo una exactitud del 91% (López-García, Andreu-García, Blasco, Aleixos, & Valiente, 2010). En aceitunas la aplicación de este seguimiento por defectos ha llegado a una clasificación correcta entre el 80-100% (Riquelme, Barreiro, Ruiz-Altisent, & Valero, 2008).

La pérdida de la firmeza es uno de los factores más importantes de calidad, especialmente en papayas. El análisis de imágenes se ha aplicado en este ámbito satisfactoriamente, encontrando exactitudes del 95% en manzanas deshidratadas (Fernandez, Castellero, & Aguilera, 2005). En los últimos años nuevas técnicas para predecir la firmeza de las frutas han sido estudiadas, entre las que encontramos análisis hiperespectral (ElMasry, Wang, ElSayed, & Ngadi, 2007; R. Lu, 2007; Refund Lu, 2008), multiespectral (Lleó, Barreiro, Ruiz-Altisent, & Herrero, 2009; Peng & Lu, 2007) y por láser (Qing, Ji, & Zude, 2007).

El análisis de imágenes tiene una variedad de aplicaciones, pero hasta el momento no se han encontrado estudios que relacionen la actividad de la Poligalacturonasa con características morfoestructurales de células de papaya. En este estudio se pretende buscar una relación entre estos parámetros morfoestructurales celulares y la actividad de la PG en papaya fresca precortada para así evidenciar el importante rol que tiene la enzima en el ablandamiento de la fruta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Para los ensayos se empleó un espécimen en estado de madurez 6 de acuerdo a carta de color de Papaya híbrido Tainung, originaria de Taiwan (Ruggiero, Marin, & Durigan, 2011), cultivada en el Valle del Cauca, Colombia (Coordenadas: 04° 32' N 76° 06' O, altitud 975 msnm, Temperatura media 26 °C) y cosechada en noviembre 2012.

5.2 Caracterización de los estados de madurez

5.2.1 Determinación de la tasa respiratoria

Frutos de papaya de estados de madurez 1,2,3,4,5 y 6 por carta de color (figura 3), fueron cortados en trozos de 2*1 cm, pesados en unidades muestrales de 250 g y colocados individualmente en recipientes de vidrio a una temperatura de 18 ± 2 °C para ser evaluadas por dos horas. El contenido gaseoso de las cámaras fue succionado por una bomba de vacío y liberado por burbujeo en una solución de KOH 0,11 N que se valoró con HCL 0,11N para cuantificar el CO₂ generado por las muestras. Para mejorar la calidad del dato analítico se empleó una trampa de KOH 0,96 N removiendo el CO₂ en el arrastre (figura 5). Los ensayos se efectuaron por triplicado.

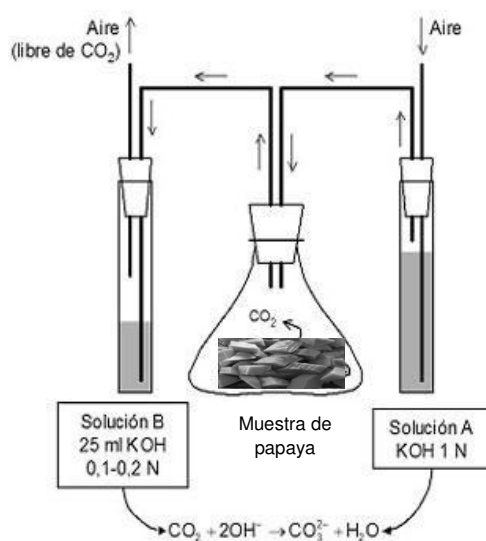


Figura 5. Ilustración de la determinación de la tasa respiratoria, adaptado (Carmona, Aguilera, Pérez, & Serey, 2006).

5.2.2 Caracterización Fisicoquímica y Textura

Los Sólidos Solubles Totales (SST) se evaluaron por refractometría en un equipo de mesa Carl Zeiss con corrección de temperatura, de acuerdo a la metodología AOAC 932.12/ 90 (Bhande , Ravindra , & Goswami, 2008). La firmeza de las muestras fue evaluada empleando un analizador de textura TA-XT2 (Stable microsystems TM) y siguiendo la metodología planteada por (Fabi, Cordenunsi, Seymour, Lajolo, & do Nascimento, 2009) con modificaciones. Las frutas cortadas en cubos de 0.7 ± 0.1 cm, provenientes de la región ecuatorial de la papaya, sin placenta y evaluadas empleando un cilindro de aluminio de 2.5 cm de diámetro, a una velocidad de 1 mm/s. El valor de firmeza correspondió al pico máximo de fuerza de resistencia a un valor total de deformación de 3 mm. Los resultados corresponden a la media de seis replicas por ensayo.

5.3 Extracción de la Enzima

Para la extracción se empleó el método descrito por Pires (2005) con modificaciones. 50 g de papaya congelada se homogeneizaron en 50 ml de NaCl (1,0 M) utilizando un Ultra-Turrax T25 a una velocidad de 838 RPM (8000 s^{-1}) durante 3 min. El homogeneizado se agitó constantemente a velocidad media a 4°C durante 3 horas y se centrifugó a 9000 RPM durante 35 min a 4°C . El sobrenadante se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.012 mm^2 y el filtrado, llamado extracto crudo, fue utilizado directamente para determinación de actividad enzimática.

5.4 Electroforesis 2D-PAGE

Los preliminares de SDS-Page se realizaron en un gel de acrilamida 12,5 %. Para concentrar la proteína, 3mL de extracto crudo se centrifugaron en una microcentrífuga eppendorf utilizando una membrana Millipore con corte de peso molecular (MWCO) de 3kDa. Para el análisis en 2D, la tira electroenfoque en un rango de pH 3-10 se rehidrató toda la noche con la muestra (140 μg) antes concentrada por filtración con membrana de 3 KDa y resuspensión en un buffer (Urea 8,5M, chap 1%, n-octyl 1%, Proteasa

inhibidor Coctel Sigma, Thiouria). El electroenfoque se realizó en un Proteon IEF CellBiorad durante 3 horas. La tira se lavó con un buffer DTT (Urea, Tris pH8.8, SDS, Glicerol, DTT) durante 15 minutos, luego se lavó con un buffer Iodoacetamida (Urea, Tris pH 8.8, SDS, Glicerol, Iodoacetamida) durante 10 minutos. Las proteínas se resolvieron en la segunda dimensión en un gel de acrilamida en gradiente (10-20) al 12,5% en un Biorad Mini Protean Tera Cell durante 3 horas. Los geles se tiñeron con Brilliant Blue R. Sigma. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar Biorad 2d SDS-Page.

5.5 Aislamiento RNA total

La extracción de RNA de papaya se efectuó mediante el kit SV Total RNA Isolation System de Promega Corporation siguiendo las indicaciones del fabricante. Partiendo de una muestra de papaya de 2 g parcialmente congelada, se congeló nitrógeno líquido y se trituró con un mortero, se pesaron valores no mayores a 30mg y se colocaron 175 uL de RNA Lysis Buffer, se agitó por inversión. Posteriormente se añadieron 350 uL del Buffer de dilución para RNA, se mezcló nuevamente por inversión y se incubó a 70°C por 3 minutos. Inmediatamente se centrifugó por 10 minutos a 13000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se añadieron 200 µL de etanol (95%), se mezcló pipeteando y se añadió la mezcla a un tubo con membrana (Spin Basket). Se centrifugó a 13000g por 1 minuto. Se descartó el líquido y se añadieron 600 µL de RNA Wash Solution y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto. Se añadieron 50 µL de DNasa directamente a la membrana del tubo (Spin Basket) y se incubó por 15 minutos en hielo. Se añadieron 200 uL de DNase Stop Solution y se centrifugó a 13000g por 1 minuto. Se realizaron dos lavados posteriores con RNA Wash Solution y finalmente se añadieron 100 uL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 13000g por 1 minuto. El filtrado se almacenó a -20°C y se utilizó para la conversión a DNA complementario. El RNA total obtenido se cuantificó en el Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

5.6 Conversión de RNA total a DNA complementario

Una vez cuantificado el RNA total se procedió a realizar la conversión empleando el Kit de síntesis de cDNA MMLV Reverse transcriptase 1st-standar cDNA (Epicentre) siguiendo las indicaciones descritas por los fabricantes y ajustando la concentración de RNA a convertir en 0,522 µg/mL para todas las muestras.

La mezcla se realizó en baño frío hasta completar un volumen final de 12.5 µL: 1µL de random Oligo(dT)21 Primer(10µM), X µL de RNA (según muestra), X µL de Agua libre de RNAsas (según muestra). Se incubó la reacción a 65°C por 2 minutos inmediatamente finalizado el tiempo se enfrió en hielo durante 1 minuto. Luego se añadieron en baño frío los siguientes reactivos: 2 µL MMLV-RT 10X Reaction Buffer, 2 µL DTT 100 mM, 2 µL dNTP Premix, 0.5 µL RiboGuard RNasa inhibitor, 1 µL MMLV Reverse Transcriptasa. Se mezcló la reacción por pipeteo e incubó a 37°C durante 60 minutos, luego se incubó a 85°C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente a 4°C durante 1 minuto. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

5.7 Amplificación de los productos cDNA

Se amplificó el gen de la poligalacturonasa por PCR, empleando los siguientes primers de Fabi (2009):

Forward: PG5RNA: 5`-GCGCGAGGATCAAATCGTGGGGGAGAC-3`

Reverse: PG3RNA: 5`- CGTACACGGACGCTCTGGGCTGCAATC -3`.

El proceso de amplificación se realizó en el equipo Icyler (BioRad), y se empleó el siguiente programa: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 58°C, y 2.5 min a 68°C y una extensión final a 68°C por 8 min. La mezcla de PCR se preparó adicionando Buffer 10x (Bioline), MgCl₂ 2 mM (Bioline), mix dNTPs 200mM (Bioline), Primer Forward 100nM 0.75 µL, Primer Reverse 100 nM 0.75 µL, Taq 1.25U (Bioline) y 2 µL de cDNA. Las muestras amplificadas se corrieron en gel de agarosa a 1.5% y

los amplímeros fueron visualizados en el fotodocumentador Quantityone (BioRad) por la presencia de una banda de 248 pb.

El gen 18S rRNA fue empleado como referencia de la expresión del gen de PG. Los primers utilizados para el 18S rRNA fueron: P1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3 y P2: 5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3 (Martinez-Garcia, et al., 2011). El gen se amplificó en el equipo Icyler (BioRad), y se empleó el siguiente programa: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 58°C, y 1 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplímeros se verificaron en gel de agarosa al 1.5%, las bandas de cDNA (550pb) fueron visualizadas en el equipo Quantityone (BioRad), por medio del software Quantityone (BioRad) se calculó la intensidad de las bandas y se halló la relación entre el gen de referencia y el gen de la PG.

5.8 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la PG fue evaluada de acuerdo con el método de 2- Cianoacetamida (Gross, 1982) con algunas modificaciones. El ensayo se basa en la liberación hidrolítica de grupos reductores del ácido poligalacturónico. Se agregaron 20 uL de extracto crudo y 30 uL de buffer Na-Acetato (100mM-pH4.4) a 150 uL de ácido poligalacturónico 0.2% (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.7 y 1% para el cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$) preparado con el mismo buffer de Na-acetato. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C y la reacción se detuvo agregando 2 mL de buffer borato (100 mM-pH9.0). Se agregaron 200uL de 2-Cianoacetamida 1%, se mezcló con vortex, se calentó en baño de agua a temperatura de ebullición durante 10 minutos y se enfrió inmediatamente en agua con hielo. El contenido de azúcares reductores se midió en un espectrofotómetro UV-Visible modelo Cary 100 Conc a $\lambda=276$ contra un blanco con los mismos componentes pero con el extracto crudo previamente calentado por 10 minutos a temperatura de ebullición. Se realizó una curva de calibración utilizando D-(+)-Ácido Galacturónico monohidratado con concentraciones entre 0 y 120 nmoles. Para garantizar la calidad de los datos se trabajó dentro del rango de

absorbancia ($0 - 1.3216 \pm 0.027$) que garantiza la linealidad de la ecuación que describe la curva de calibración (Anexo 2). Una unidad enzimática específica (U_e) se expresa como nmoles de ácido galacturónico producidas $X \text{ mg proteína}^{-1} X \text{ minuto}^{-1}$. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el equipo Qubit® Fluorometer según indicaciones del fabricante.

5.9 Análisis de imágenes

Muestras de papaya de 2g se congelaron inmediatamente en una base para micrótopo agregando Jung Tissue Freezing Medium en un ultracongelador Revco a menos $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizaron cortes de $30 \text{ }\mu\text{m}$ en un micrótopo Laica CM 1850 a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y se observaron en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse Ti-S, en un objetivo de 10x de contraste de fases. Se tomaron de 4 a 11 fotos por cada tiempo de tratamiento en una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1 acoplada al microscopio de cada tiempo. De las fotos guardadas en formato JPG. se analizaron 20 células con el software Image J 1.45s; en el software se delinearón los contornos de las células utilizando un mousepen i608x, se transformaron a escala de grises (8 bits), se aumentó el contraste 50% y se ajustó el umbral "*Threshold*" manualmente para resaltar los contornos celulares.

5.10 Análisis estadístico

El experimento se planteó como un estudio cuantitativo, descriptivo y longitudinal que evalúa en 9 momentos secuenciales en el avance de la senescencia en el tiempo (diseño experimental en el anexo 7). Los resultados obtenidos se analizaron mediante comparación de varianzas ANOVA ($p < 0.05$) observadas por tratamiento, en este caso el tiempo de exposición al ambiente. La diferencia detectada se verificó grupo a grupo por comparación de medias de tratamientos, a través de Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20. Se realizó un análisis por componentes Principales a través del software SAS versión 9.2.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Caracterización de los estados de madurez

De acuerdo con los estudios efectuados por otros autores se espera encontrar una relación inversa entre la pérdida de firmeza y el estado de madurez (Torres, Montes, Pérez, & Andrade, 2012). Los resultados evidencian que a lo largo del proceso de madurez se presenta una reducción de la firmeza que mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) y una tendencia proporcional con alta significancia para con contraste lineal ($p < 0,001$), y correlación con los cambios en SST, que se incrementan linealmente (figura 6). La variedad Golden presenta una reducción en la firmeza superior al 80% por efecto del avance de la madurez (Fabi, Cordenunsi, Seymour, Lajolo, & do Nascimento, 2009). Para las muestras evaluadas en este estudio se observa que la relación entre SST y firmeza muestra un comportamiento lineal inverso con una pendiente de -9.437 para un $R^2 = 0.94$, en el rango evaluado. La pendiente indica que el incremento en 1% SST produce una disminución de 9.437 N en la firmeza.

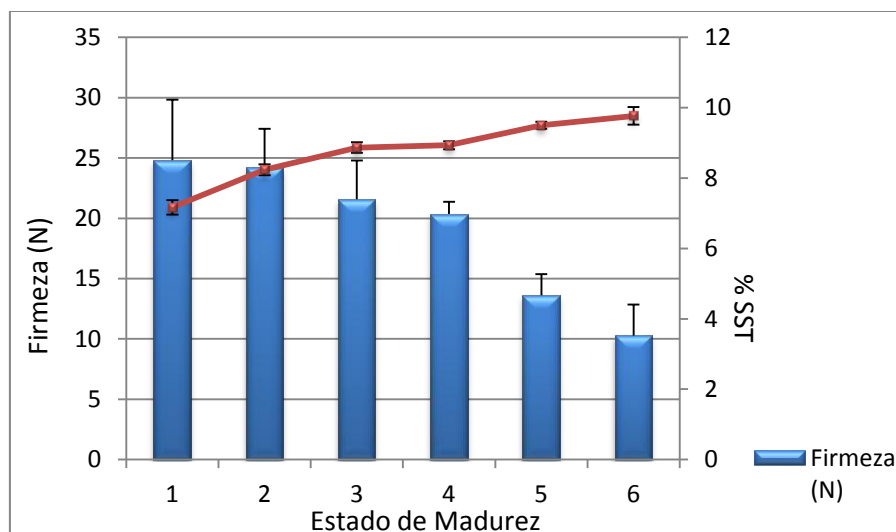


Figura 6. Firmeza de papaya y SST frente al avance de la madurez. Los números inferiores indican los estados de madurez (1-6).

La tasa respiratoria indicada en la figura 7 muestra el comportamiento esperado para un fruto climatérico, con un máximo para el estado de madurez 4.

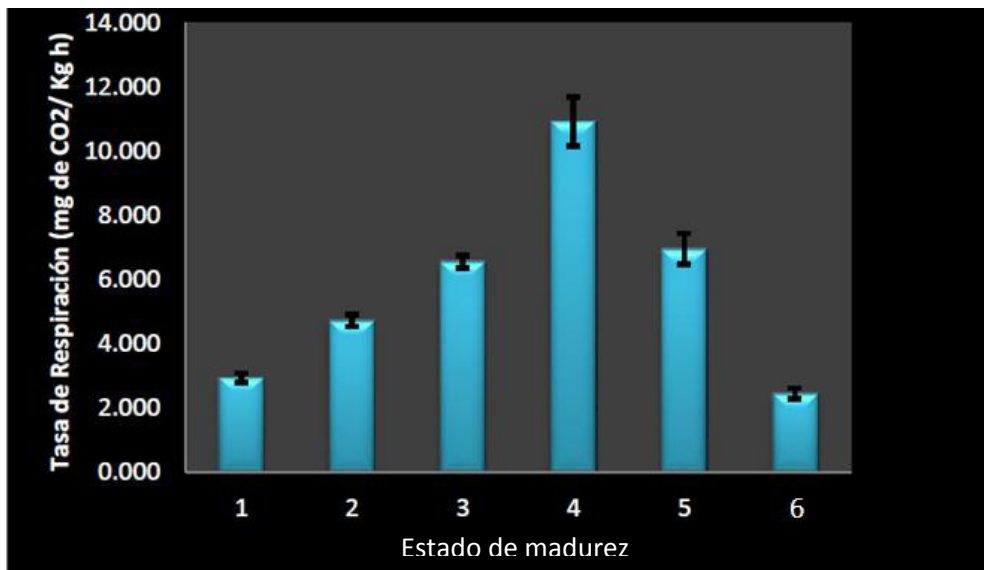


Figura 7. Relación entre la tasa respiratoria y el avance en la madurez. Los números inferiores indican los estados de madurez (1-6).

Teniendo en cuenta que para papaya otros autores han encontrado que existe una relación entre la actividad de las hidrolasas y la pérdida de firmeza de papaya, se elige el grado de madurez 6 que presenta el máximo ablandamiento, por ello se esperaría encontrar la máxima actividad de la poligalacturonasa en este estado (Fabi, Cordenunsi, Seymour, Lajolo, & do Nascimento, 2009; Robert. E. Paull & Chen, 1983).

6.2 Electroforesis SDS-Page y 2D-Page.

Se realizó una electroforesis SDS-Page de los extractos enzimáticos en cada tiempo. En relación al marcador de peso molecular, el extracto proteico aislado evidencia la posible presencia de endopoligalacturonasa con un peso molecular aproximado de 29KDa. Este peso molecular es similar a lo reportado para banana (Pathak, Mishra, & Sanwal, 2000).

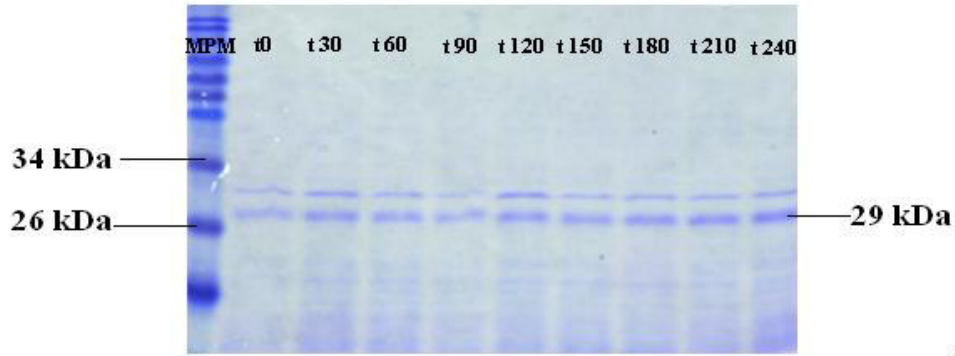


Figura 8. Electroforesis SDS Page. MPM: Marcador de Peso Molecular de proteína. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: PG a diferentes minutos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 de exposición después del corte de 5mm respectivamente.

En la papaya como fruto climatérico, la maduración es el resultado de la activación del metabolismo de paredes celulares, síntesis de azúcares y otros compuestos, siendo estos cambios dependientes de la modificación en la expresión de diversos genes que controlan la regulación de la expresión de proteínas regulatorias o enzimas (Nogueira, Labate, Gozzo, Pilau, Lajolo, & Oliveira do Nascimento, 2012). El gel revelado en la figura 8 muestra bandas de proteínas discriminadas exclusivamente por su peso molecular, y deben ser diferenciadas utilizando una técnica más específica. Ensayos preliminares mostraron que la PG y la PME para esta variedad de papaya en el grado de madurez evaluado presentaban valores de 29 y 31 kDa respectivamente, difíciles de diferenciar por 1D.

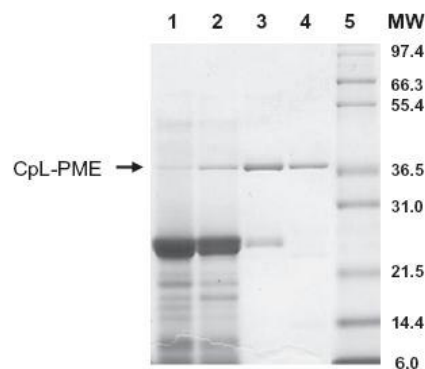


Figura 9. SDS-Page de purificación de PME de Extracto de papaína comercial. Fuente: Vasu, 2012.

Nogueira y colaboradores encuentran en la evaluación de proteínas por electroforesis 1D que la papaya presenta dos bandas bien diferenciadas a 29 y 31kDa, también identificadas en las electroforesis realizadas en las papayas colombianas. Igualmente informa que tanto el grupo de papaya que se encuentra tanto en estado verde como maduro, a los cuales él denomina pre-climatéricos y climatéricos, presentan ambas bandas a 29 y 31 kDa pero no son reportadas en la diferenciación por la técnica 2D-DIGE.

La separación 2DE-Page utilizando un gradiente de pH entre 3 y 10 permitió encontrar para el extracto de proteína evaluado la separación de dos enzimas de pesos moleculares muy similares. La electroforesis 2DE-Page se encuentra en la figura 10.

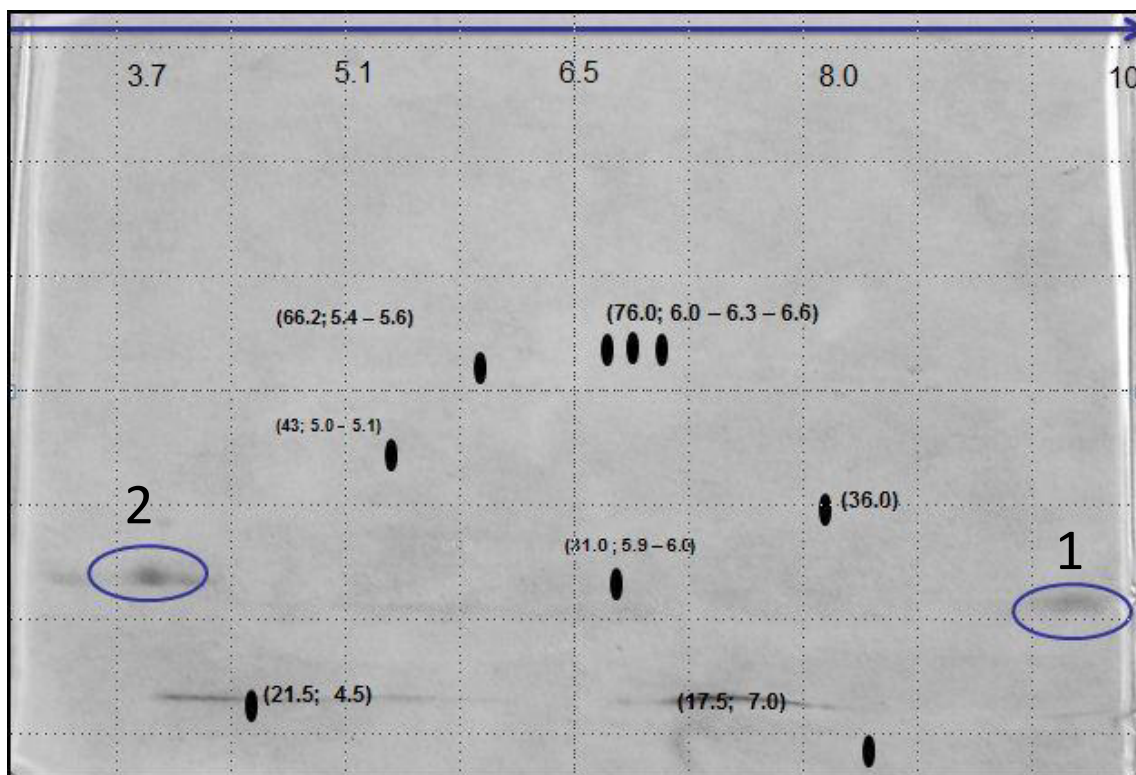


Figura 10. Electroforesis 2DE-PAGE de extractos de Papaya Tainung. Los puntos negros indican el marcador de peso molecular. Los puntos 1 y 2 indican las proteínas de interés.

Los dos puntos observados corresponden a las proteínas mayoritariamente extraídas por el proceso de solubilización en sal sin rompimiento de membranas celulares, esto muestra que aparentemente las actividades de la PME y de la PG son principalmente responsables del ablandamiento de las paredes celulares. Sin embargo, será necesario hacer extracciones con otras metodologías para poder observar y diferenciar otras enzimas que pudieran estar actuando de manera simultánea. El estudio más reciente encontrado muestra que el análisis proteómico total por 2D muestra que el total de proteínas encontradas pueden ser separadas en nueve grupos que se discriminan de acuerdo con la figura 11 que aparece a continuación:

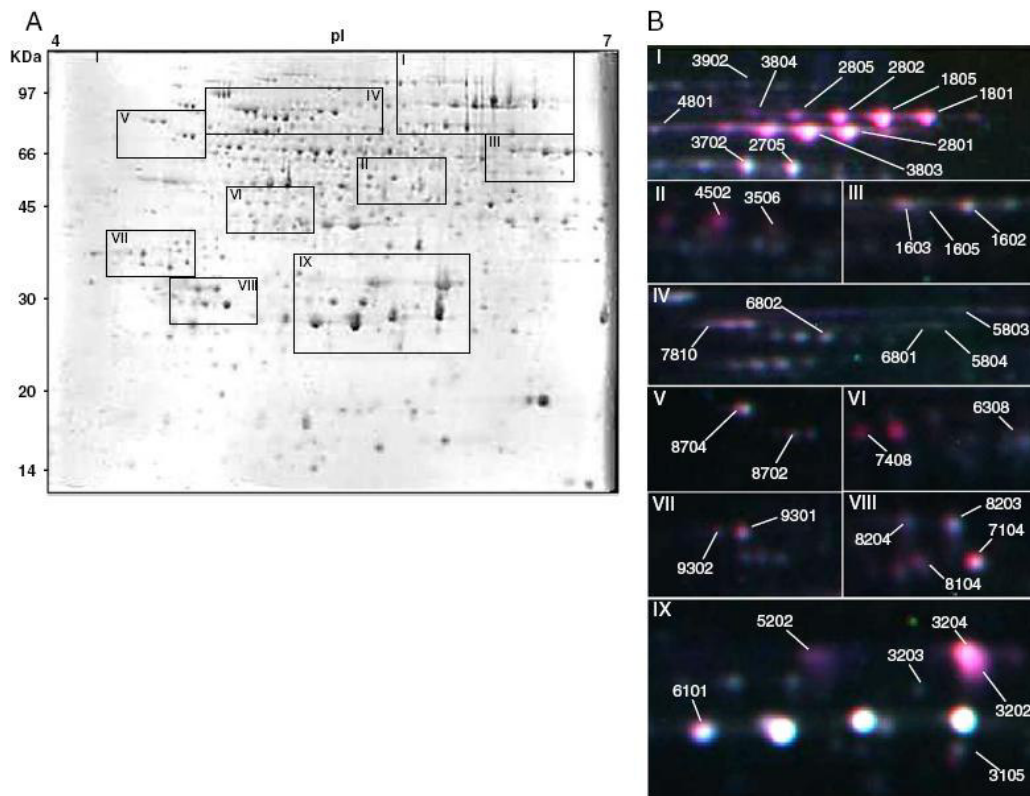


Figura 11. 2D-DIGE mapa de papaya. Fuente: Nogueira, 2012.

Aparentemente la PG encontrada (Punto 1) correspondería a un punto por encima de pH7, rango de pH que no fue tenido en cuenta en esta evaluación. El valor aproximado del punto isoeléctrico se encuentra en 9 y coincide con los valores superiores a 8 encontrados para endopoligalacturonas purificadas de tomate (Z. M. Ali & Brady,

1982). La banda que se encuentra en punto isoeléctrico ácido (Punto 2) correspondería a los puntos del grupo VII ubicados a aproximadamente 31 kDa, entre los que se esperaba encontrar la PME. Sería necesaria una secuenciación de los puntos 1 y 2 para asegurar la identificación de PG y PME en los geles analizados.

6.3 Determinación de la expresión de la PG.

Cortes de papaya de 5mm de espesor se expusieron a una humedad relativa de 55% y una temperatura de 18°C. Se tomaron 2g a las 0, 2 y 4 horas de exposición para realizar el respectivo aislamiento de RNA, conversión a cDNA y la amplificación del mismo. Se empleó como gen HouseKeeping el gen 18S rRNA (figura 12). El proceso de extracción de RNA se realizó por triplicado para cada muestra, pero en una réplica de la hora 0 y 2, y en dos réplicas de la hora 4 no se logró extraer suficiente RNA para cuantificarlo y poder tener la misma cantidad en la conversión a cDN, por lo que los resultados de la expresión se muestran por duplicados a las 0 y 2, y una sola réplica para las 4 horas.

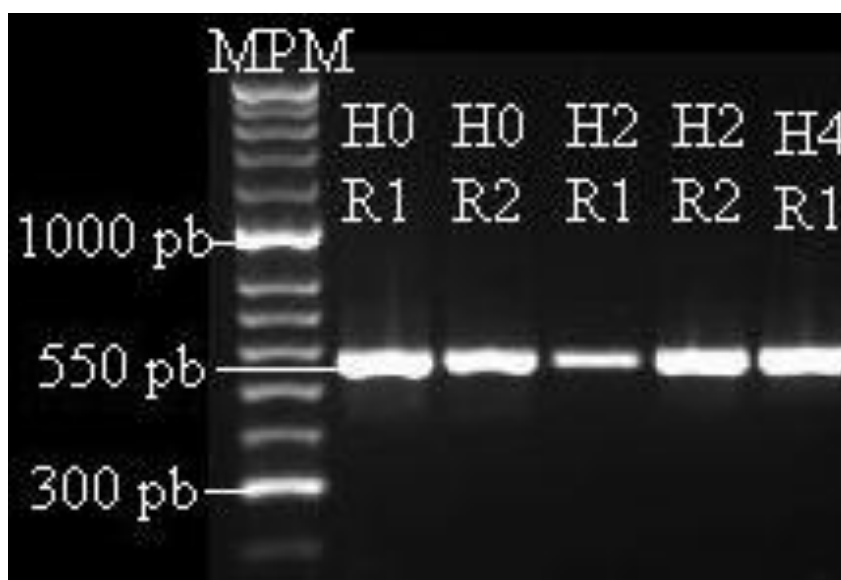


Figura 12. RT-PCR del Gen HouseKeeping 18S rRNA. MPM: Marcador de Peso Molecular. Carril 1: Réplica 1 a las 0 horas. Carril 2: Réplica 2 a las 0 horas. Carril 3: Réplica 1 a las 2 horas. Carril 4: Réplica 2 a las 2 horas. Carril 5: Réplica 1 a las 4 horas.

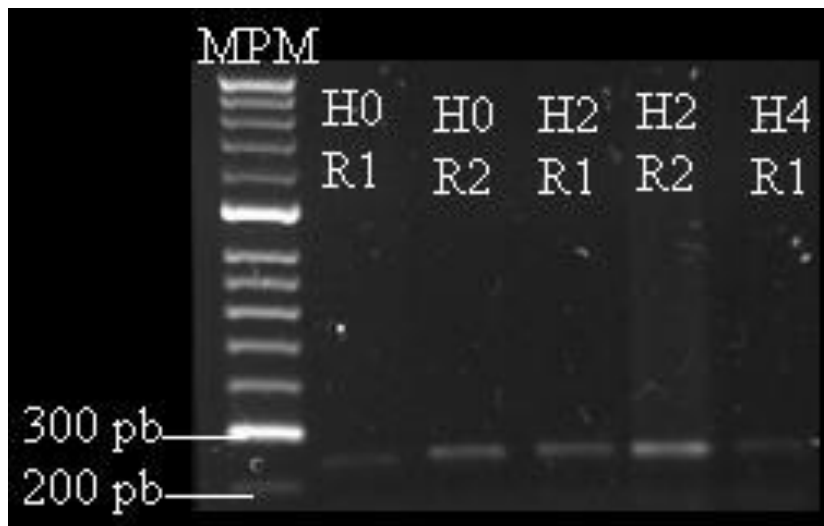


Figura 13. RT-PCR del Gen de Poligalacturonasa. MPM: Marcador de Peso Molecular. Carril 1: Réplica 1 a las 0 horas. Carril 2: Réplica 2 a las 0 horas. Carril 3: Réplica 1 a las 2 horas. Carril 4: Réplica 2 a las 2 horas. Carril 5: Réplica 1 a las 4 horas.

En la figura 13 se muestran los resultados de la RT-PCR para la expresión del gen de la poligalacturonasa. Se realizó una amplificación de una fracción de 248pb de la secuencia de cDNA de una endopoligalacturonasa de *Carica papaya* Golden con maduración inducida (GenBank: FK759818.1) (Fabi, Lajolo, & Nascimento, 2009). La enzima se expresa en los tres tiempos, se observa un aumento de la expresión a las 2 horas de exposición, con una disminución a las 4 horas.

6.4 Determinación de los parámetros descriptores de la actividad enzimática

Una vez se caracterizaron los estados de madurez a través de la evaluación de la firmeza y los sólidos solubles totales se realizó una extracción enzimática del estado de madurez 6, el cual presentó menor firmeza, para establecer los parámetros enzimáticos de K_m y velocidad máxima de la PG. Para esto se halló la actividad enzimática a diferentes concentraciones de ácido poligalacturónico y se linealizó mediante la ecuación de Lineweaver-Burk (Dowd & Riggs, 1965; Wilkinson, 1961):

$$\frac{1}{U} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[Sustrato]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

En donde:

U (upsilon) representa la velocidad de reacción.

K_m es la constante numéricamente igual a la concentración de sustrato a la mitad de la velocidad máxima.

$V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima.

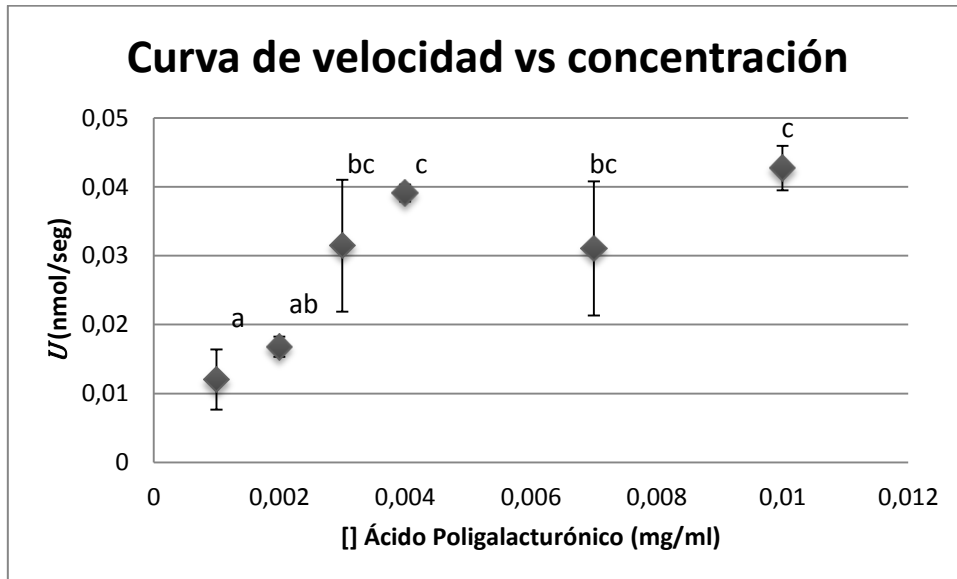


Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PG. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

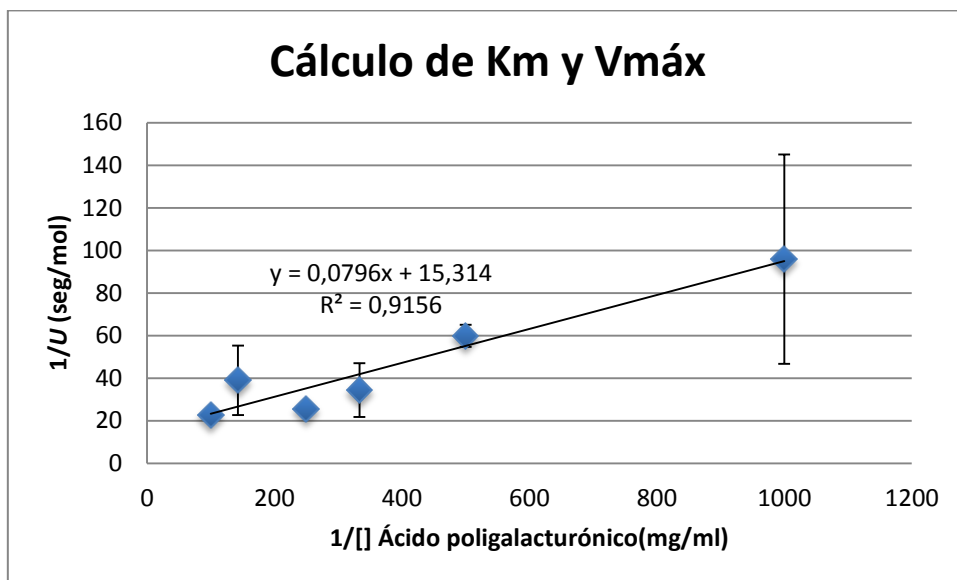


Figura 15. Linealización Lineweaver-Burk.

En la figura 14 se observa un incremento en la actividad enzimática hasta llegar a la concentración de 0.004 mg/ml en la cual aparentemente se alcanza la velocidad de reacción máxima, por encima de esta concentración se observa una disminución en la

concentración 0.007 mg/ml, aunque no significativa, en la actividad. La velocidad máxima hallada para la poligalacturonasa es de 0,06532 nmol ácido poligalacturónico s⁻¹, una velocidad aproximadamente 6 veces superior a la mostrada en frutas provenientes de cultivos no estandarizados de Zimbabwe (Muchuweti, Moyo, & Mushipe, 2005) y muy similar a la mostrada en Pitayo amarillo (Rodríguez Castro, Narvaez Cuenca, & Restrepo Sanchez, 2006). El valor obtenido para K_m a partir de la ecuación (figura 15) fue de 0.0051 mg/ml, un dato bajo de acuerdo con los valores de 1.5 y 2.4 mg/ml reportados en banano (Pathak, Mishra, & Sanwal, 2000) y pitayo (Rodríguez Castro, Narvaez Cuenca, & Restrepo Sanchez, 2006) respectivamente. Si se tienen en cuenta estos valores de K_m, la afinidad de la PG obtenida de papaya es más alta que la mostrada en pitayo, donde se utiliza el mismo sustrato, y también es más alta que la obtenida en banano donde utilizan como sustrato pectina cítrica; aunque en estos dos casos utilizan un método para evaluar la actividad enzimática (DNS) menos sensible que el utilizado en este trabajo (2-Cianoacetamida) y la reacción enzimática se realizó a diferentes condiciones de temperatura y pH, por lo que la actividad enzimática puede variar de acuerdo a las diferentes condiciones empleadas (Chan Jr & Tam, 1982).

6.5 Determinación de la actividad enzimática después del corte

Cortes de papaya de 5mm de espesor se expusieron a una humedad relativa de 55% y una temperatura de 18°C. Se tomaron 50g a los 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos de exposición para realizar los extractos enzimáticos.

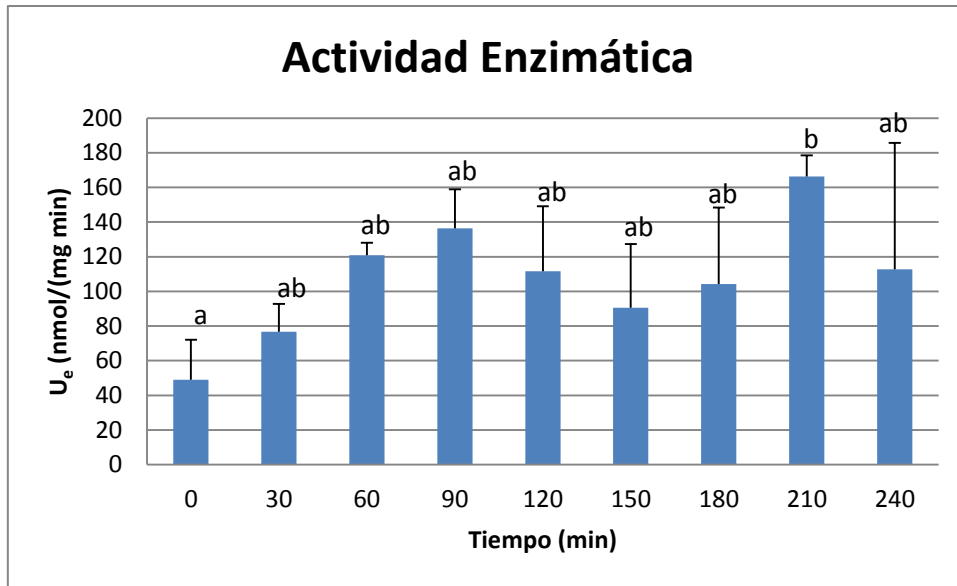


Figura 16. Comportamiento de la actividad enzimática específica durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En la figura 16 se observa un incremento en la actividad al inicio del tiempo de exposición (0-90 min) y una tendencia a estabilizarse alrededor de los 140-160 nmol $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, con un máximo de actividad a los 210 minutos. Los valores encontrados en este estudio son más altos (superiores a 100 veces) a los reportados en zanahorias (24,5 nmol $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) a las mismas condiciones de extracción (Pires & Finardi-Filho, 2005). En fresas maduras la actividad enzimática específica muestra también valores menores (5 nmol $\text{Kg}^{-1} \text{s}^{-1}$) a los de la figura 16 (aproximadamente 100 veces menos) (Villarreal, Rosli, Martínez, & Civello, 2008), donde el proceso de extracción es más complejo. Valores encontrados en bananas tratadas con etileno (500 nmol $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) muestran ser superiores (16 veces) a los presentados en este estudio, donde trabajaron una concentración de sustrato superior (1%) y un buffer de extracción más complejo (Lohani, Trivedi, & Nath, 2004). Reportes de actividad enzimática en papaya también muestran ser menores (31 veces) a los de la figura 16 (Fabi, Cordenunsi, Seymour, Lajolo, & do Nascimento, 2009), con lo que se puede concluir que la fuente de donde se extrae la enzima, el método de extracción, la técnica de medida de la actividad enzimática y sus condiciones de incubación son factores importantes a tener en cuenta durante la determinación de la actividad enzimática de la PG.

6.6 Expresión Génica y Actividad Enzimática

La expresión de la poligalacturonasa ha sido relacionada positivamente con la pérdida de firmeza en la maduración de frutas como manzana, bananas, melón y fresas. La expresión de esta enzima también ha sido estudiada en papaya. No es fácil establecer en un tejido vivo que enzima específica está actuando sobre un sustrato determinado. Para ello se podría llegar al uso de marcadores moleculares que eventualmente posibilitarían un acercamiento a la actividad de la enzima. Sin embargo, en este trabajo se combinó una observación multinivel en la que los cambios moleculares reflejan cambios estructurales en el tejido, para lograr esto se requirió evaluar los cambios de actividad y relacionarlos con la expresión génica. Para establecer la relación entre la actividad de la Poligalacturonasa y la expresión génica se efectuó una aproximación a un modelo por el método gráfico (figura 17). La intensidad relativa en escala de grises, con magnitudes entre 0 y 1, se emplea como un seguimiento semicuantitativo de los datos obtenidos en las PCR para el tiempo de evaluación. Los puntos rojos representan tiempos puntuales (Amnuaysin, Jones, & Seraypheap, 2012). Se encontró una relación lineal ($R^2=0.9996$ y un coeficiente de determinación de Pearson $r=0.9998$) directamente proporcional con una razón de cambio de 1.18 unidades que indican que por cada unidad en incremento en la actividad enzimática específica se produce un incremento en $1\frac{1}{5}$ en la expresión génica relativa. El valor del punto de corte indica que en el material evaluado no se presenta un valor de actividad enzimática igual a cero.

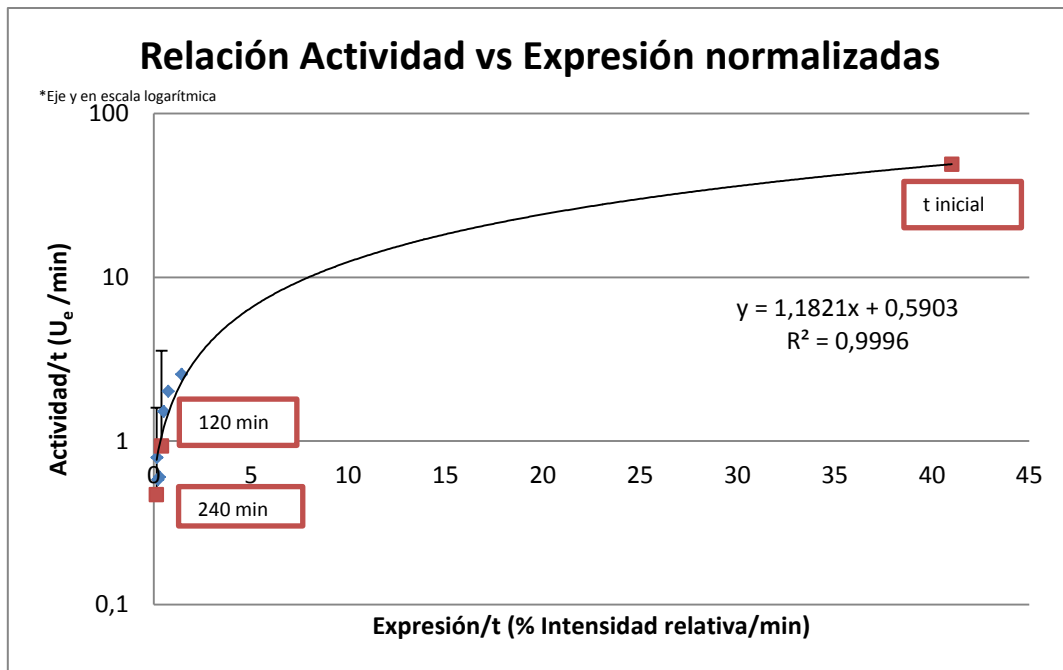


Figura 17. Relación entre la Expresión y Actividad Enzimática específica de la Poligalacturonasa durante su exposición a 18°C y 55%HR. El eje de las ordenadas se encuentra dispuesto en escala logarítmica sin generar un cambio en las magnitudes trabajadas.

En papaya Golden se encontró un clon de 633pb muy similar a una endopoligalacturonasa de durazno (*Prunuspersica*); esta endopoligalacturonasa de papaya presentó un incremento en la expresión relativa de 13 puntos después de doce horas de someter la fruta a etileno, siendo inversamente correlacionado con la firmeza de la fruta y sugiriendo un rol de esta enzima en la degradación de la pectina, debido a la pérdida de adhesión celular lo que ocasiona un ablandamiento en la fruta (Fabi, Lajolo, & Nascimento, 2009).

Diversos estudios han encontrado relación entre la expresión génica, la actividad enzimática y los cambios en firmeza. Otra secuencia encontrada en papaya Golden de cDNA de 1444 pb (Gen Bank: FJ007644) de PG en un estudio donde se sugiere de una fuerte relación entre el ablandamiento de la papaya y los cambios en la fracción soluble en agua de polisacáridos de la pared celular, deja una posibilidad abierta de la manipulación de este gen para controlar el proceso de ablandamiento de papaya durante su maduración (Fabi, Cordenunsi, Seymour, Lajolo, & do Nascimento, 2009).

6.7 Cálculo de las características morfoestructurales celulares

Cortes de papaya de 5mm de espesor se expusieron a una humedad relativa de 55% y una temperatura de 18°C. Se tomaron 50g a los 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos de exposición y se congelaron inmediatamente para realizar los cortes de 30 μm y tomar las fotos en el microscopio (figura 18). Cada ensayo contó con 20 réplicas y se analizaron los siguientes factores de forma y tamaño: Área, perímetro, factor A/P, Diámetro de Ferret, Relación de aspecto AR, redondez, últimos que muestran cuan esférico es el objeto, y solidez, que indica la ausencia de discontinuidades en la superficie.

En la figura 18 se observa las micrográficas de los cortes de tejido expuesto. Cada tiempo de exposición permite observar la forma celular y sus variaciones por efecto de exposición a ambiente. La fruta fresca muestra células aparentemente más redondeadas y fuertemente unidas entre sí, pero en el avance del tiempo el espacio intercelular se incrementa mostrando pérdida de la estructura de la matriz celular por avance de la senescencia (Brummell, Dal Cin, Crisosto, & Labavitch, 2004; Hodges & Toivonen, 2008).

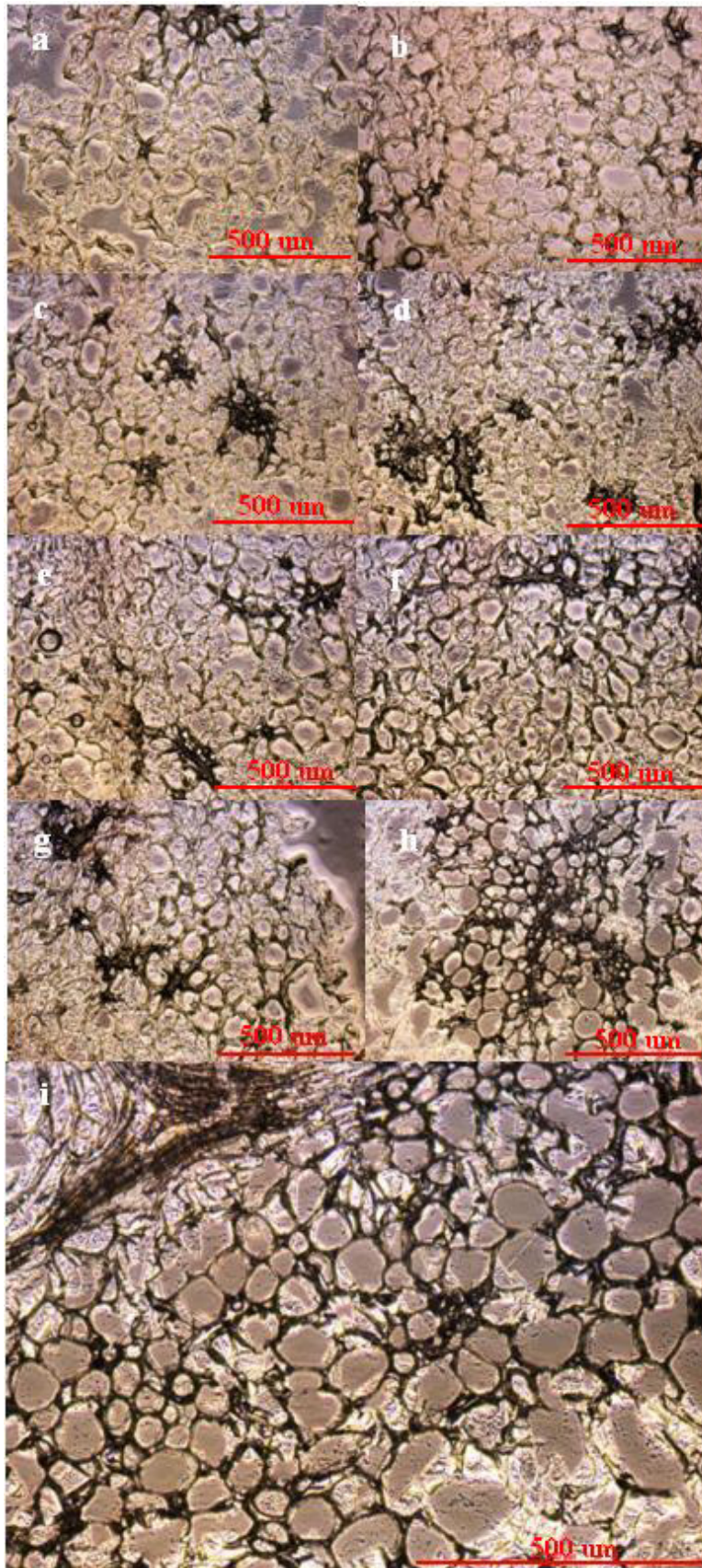


Figura 18. Fotos de los cortes con micrótopo de 30 μm observados en un microscopio con objetivo 10x en contraste de fases. a) 0 minutos de exposición. b) 30 minutos de exposición. c) 60 minutos de exposición. d) 90 minutos de exposición. e) 120 minutos de exposición. f) 150 minutos de exposición. g) 180 minutos de exposición. h) 210 minutos de exposición. i) 240 minutos de exposición

Las figuras 19, 20, 21 muestran los cambios para las características morfoestructurales de tamaño: área, perímetro, ferret, respectivamente durante la senescencia de papaya fresca precortada en el período evaluado bajo las condiciones de experimentación.

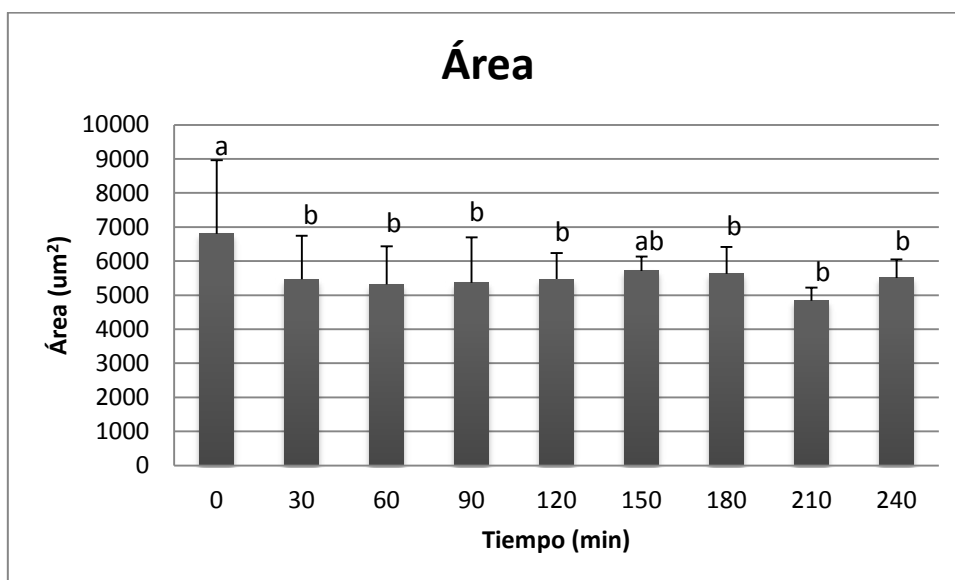


Figura 19. Comportamiento del área celular durante su exposición a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

En la figura 19 se muestra el comportamiento del área celular durante la exposición del tejido a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 55%HR. Se encontró diferencia significativa entre los tiempos ($p < 0.05$), un área celular máxima del tejido sin ninguna exposición al ambiente, es decir inmediatamente después del corte, y una mínima a los 210 minutos. El mismo comportamiento se observa para Perímetro y Ferret (figuras 20 y 21 respectivamente).

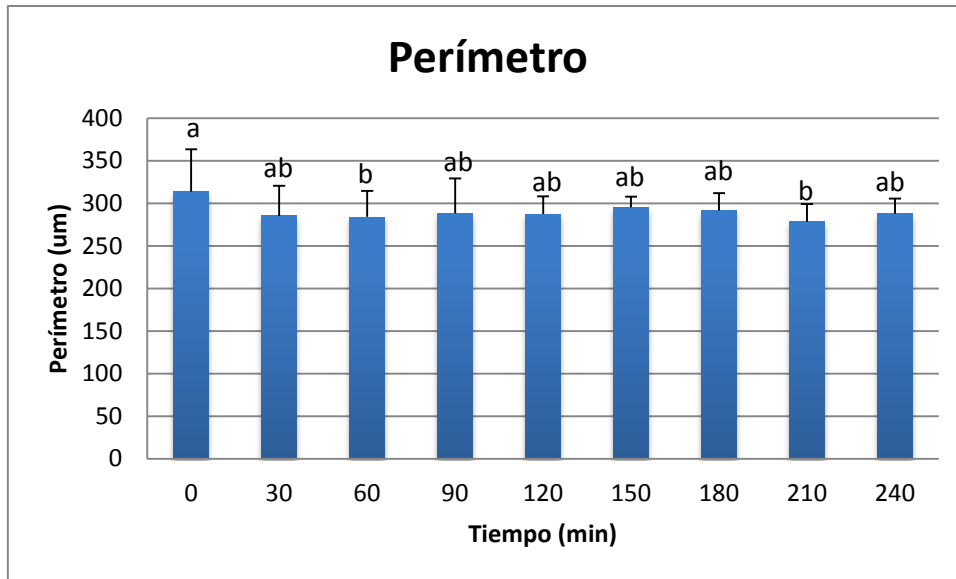


Figura 20. Comportamiento del perímetro celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

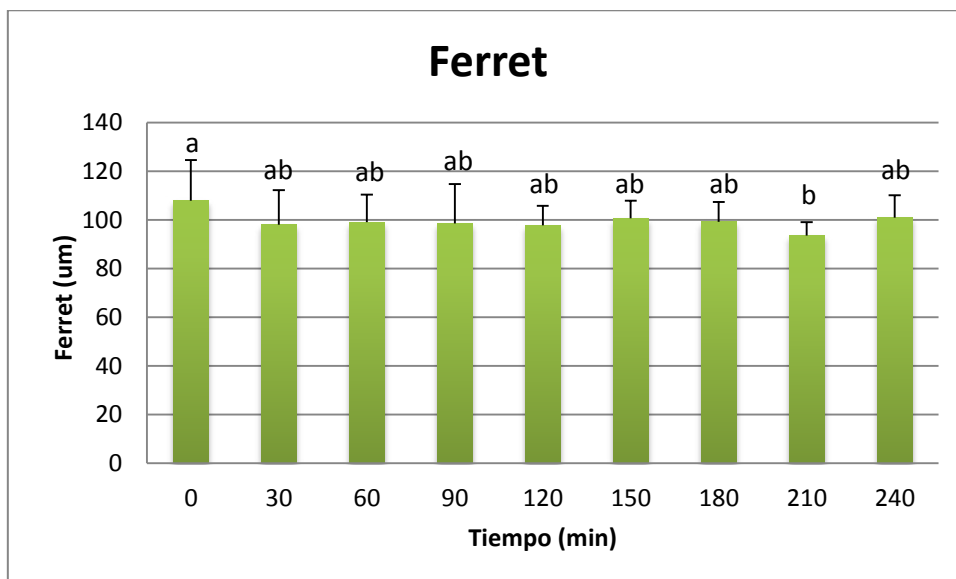


Figura 21. Comportamiento del Diámetro de Ferret celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Para describir mejor los cambios se propuso evaluar un descriptor complementario. La relación área perímetro corresponde a una descripción de la irregularidad de la partícula. Para un objeto esférico se espera que la relación proporcione un valor de longitud equivalente al radio de la partícula, pero al incrementar el perímetro para una misma área produce una magnitud superior a la esperada para el radio, indicando la

irregularidad del objeto. Se ha utilizado esta relación para definir la relación fractal del objeto (Arenas-Ocampo, et al., 2012), aspecto que no está contemplado como objetivo del presente trabajo.

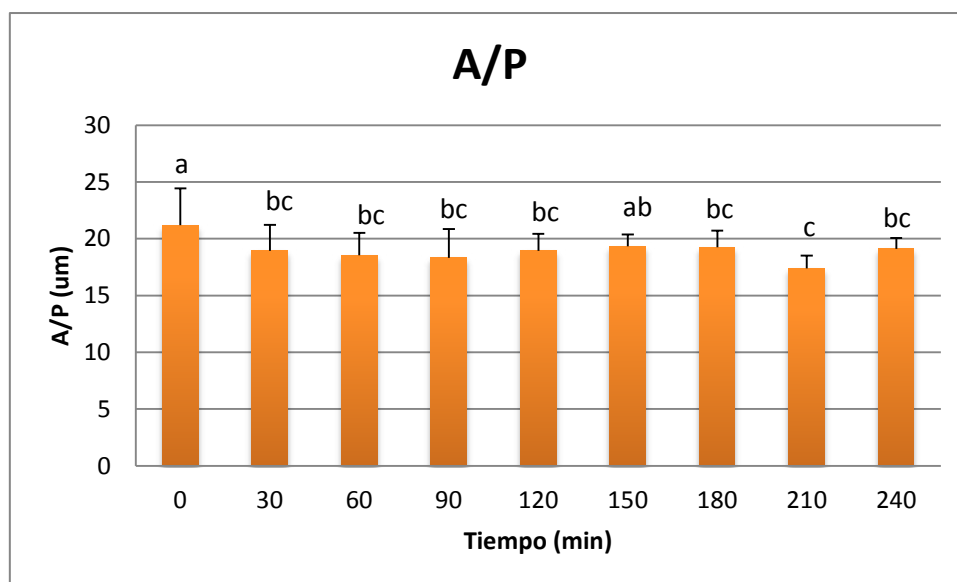


Figura 22. Comportamiento del factor A/P celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados de factores de tamaño restantes (Perímetro, relación área/perímetro y Ferret) presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos y muestran un comportamiento similar al área celular, con un máximo al inicio de la exposición inmediatamente después del corte (0 minutos) y un mínimo a los 210 minutos. Las células presentan su mayor disminución de tamaño en los primeros 30 minutos, a partir de ese tiempo el tamaño celular tiene aparentemente un comportamiento ondulatorio, repetitivo más pronunciado al inicio, lo que indica la importancia de los primeros minutos en el inicio del colapso celular que conduce a la senescencia de la papaya fresca precortada (Brummell, Dal Cin, Crisosto, & Labavitch, 2004; Hodges & Toivonen, 2008).

Las figuras 23, 24, 25, 26 muestran los cambios de las características morfoestructurales de forma: redondez, proporción de aspecto, circularidad y solidez durante la senescencia de papaya fresca precortada en el período evaluado bajo las condiciones de experimentación.

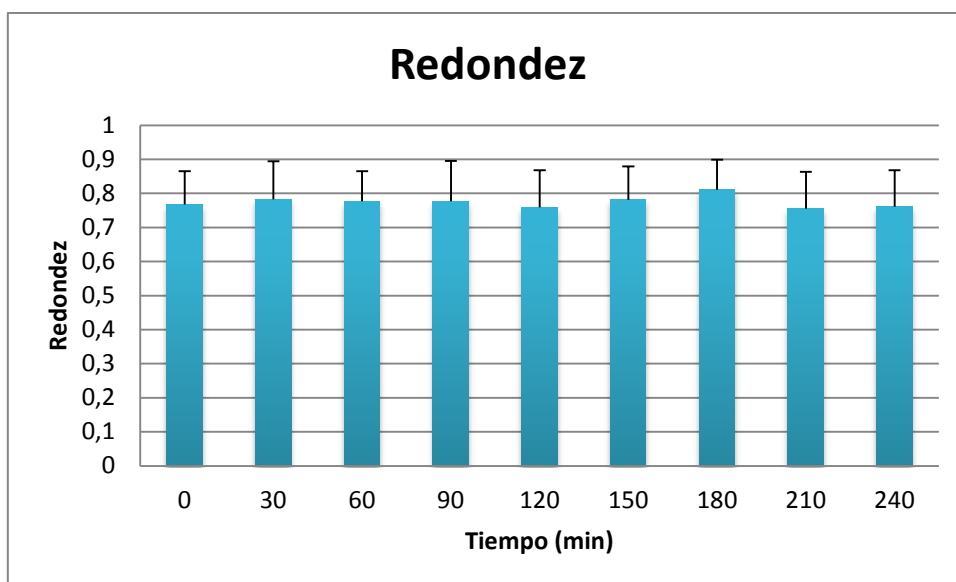


Figura 23. Comportamiento de la redondez celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), no se mostraron diferencias significativas.

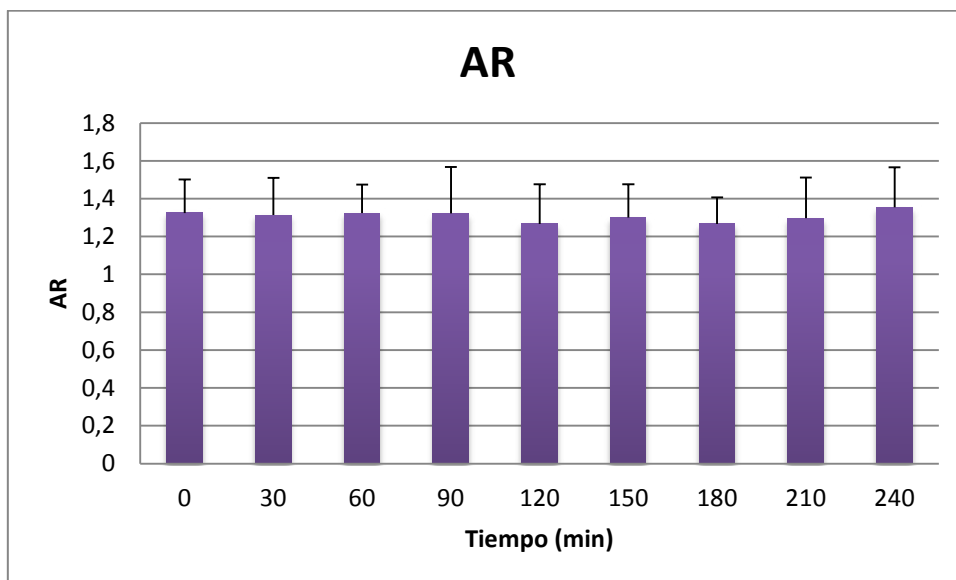


Figura 24. Comportamiento de la Proporción de Aspecto celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), no se mostraron diferencias significativas.

Las figuras 23 y 24 revelan los atributos celulares de redondez y elongación (AR) respectivamente durante la senescencia de papaya fresca precortada. No se encontró

diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tiempos en ninguno de los dos atributos, lo que sugiere una pérdida de tamaño de las células, mayoritariamente en los primeros 30 minutos manteniendo una proporción y redondez, esto se corrobora con los resultados obtenidos para área, perímetro, Ferret y A/P en las figuras 19, 20, 21 y 22 respectivamente..

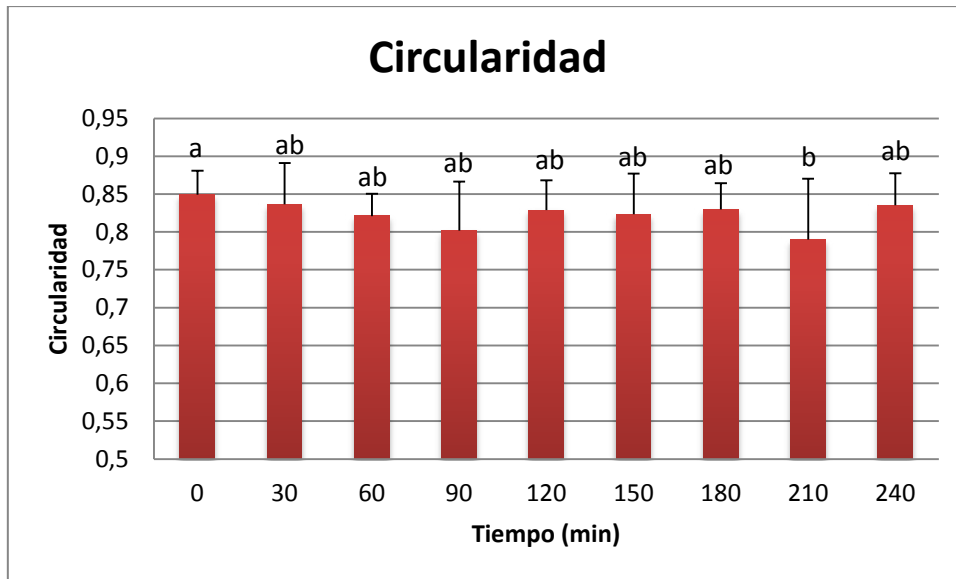


Figura 25. Comportamiento de la circularidad celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

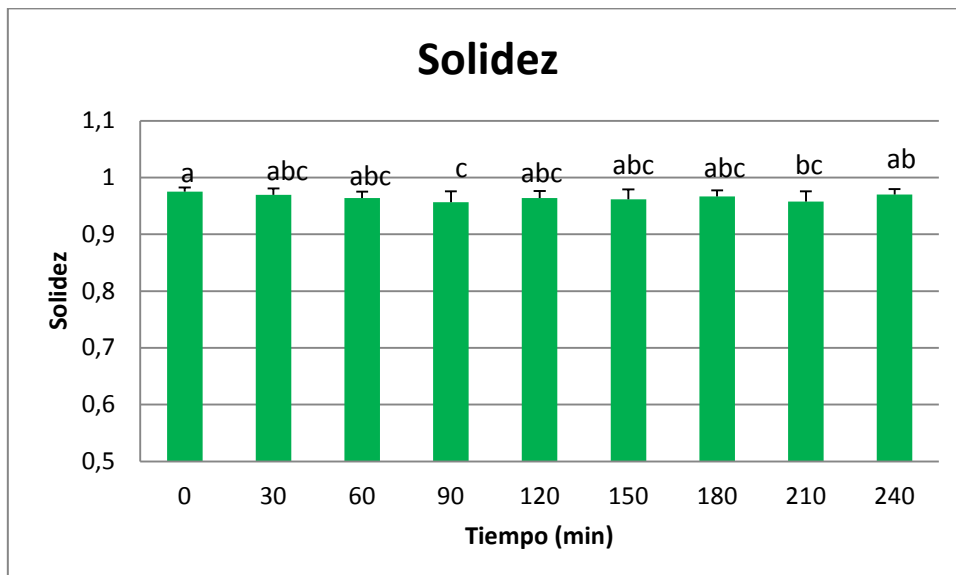


Figura 26. Comportamiento de la solidez celular durante su exposición a 18°C y 55%HR después de un corte de 5mm. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p < 0.05$), diferentes letras indican diferencias significativas con la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.5$) entre los tiempos de senescencia para los atributos de forma circularidad y solidez (figuras 25 y 26 respectivamente) con un máximo y un mínimo a los 0 y 210 minutos respectivamente y un comportamiento similar a los factores de tamaño.

6.8 Relación entre la actividad enzimática específica de la PG y las características morfoestructurales celulares en papaya.

Se calculó la relación actividad enzimática vs parámetro morfoestructural (figuras 27-31), se halló una correlación inversa en todos los parámetros de tamaño y en circularidad de los parámetros de forma. Esos mismos resultados se hallaron en melón (Casas-Forero & Cáez-Rámirez, 2011), el cambio de la actividad enzimática genera un efecto destructivo de las paredes celulares que ocasiona un cambio en los parámetros morfogeométricos de la célula.

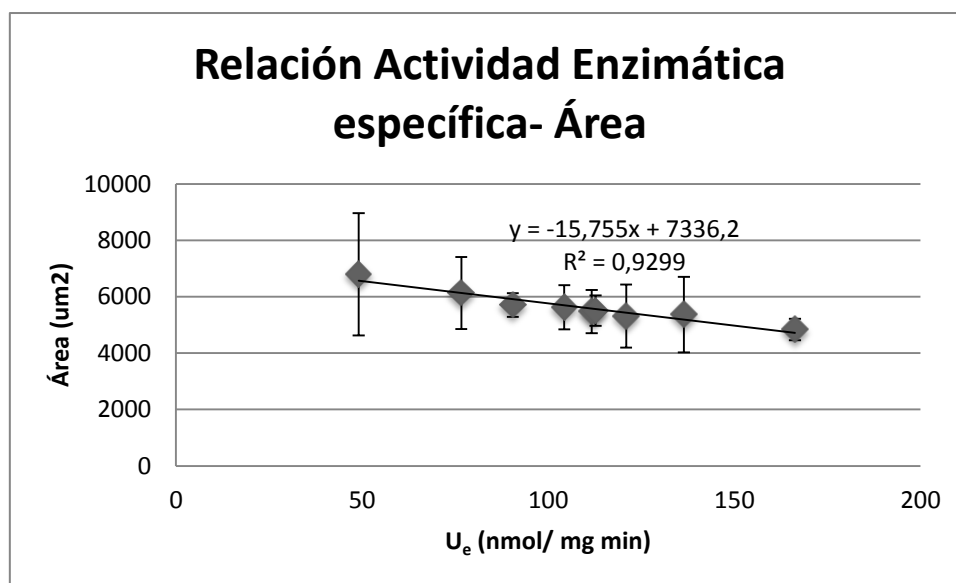


Figura 27. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el área celular.

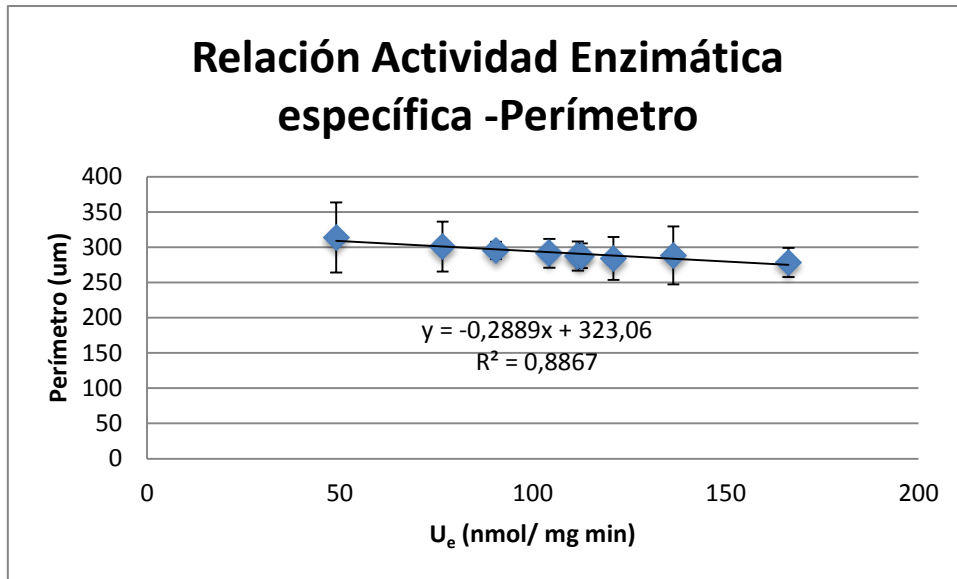


Figura 28. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el perímetro celular.

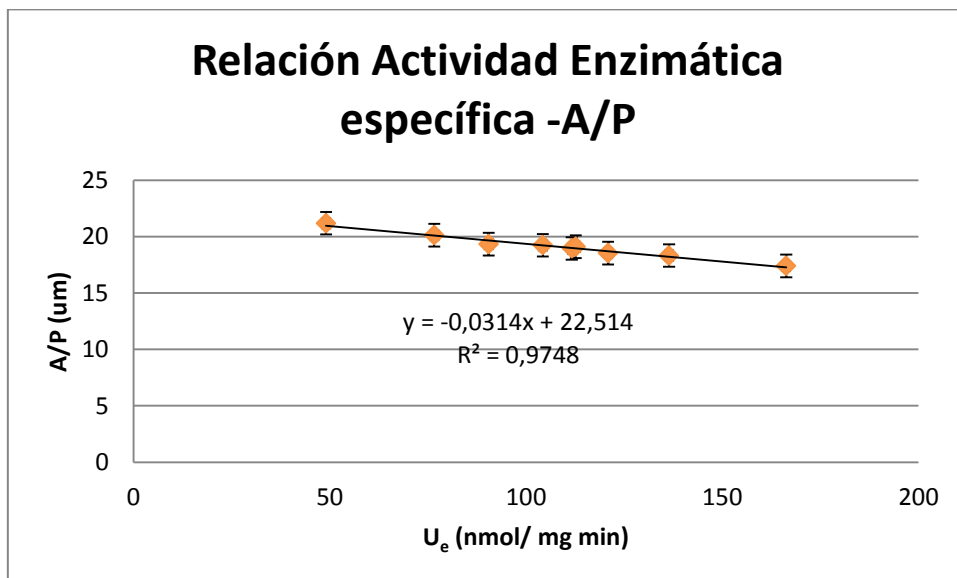


Figura 29. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el factor A/P celular.

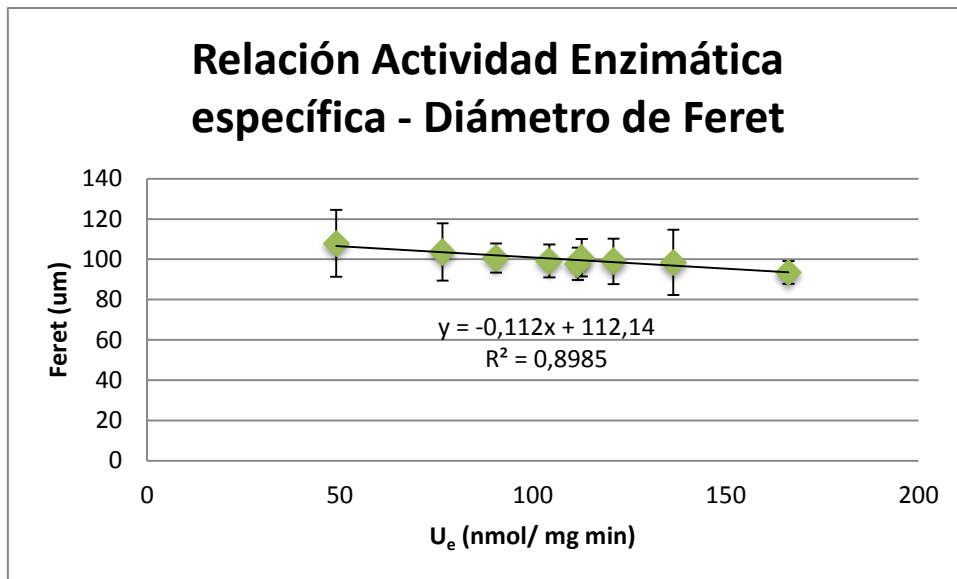


Figura 30. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el Diámetro de Feret celular.

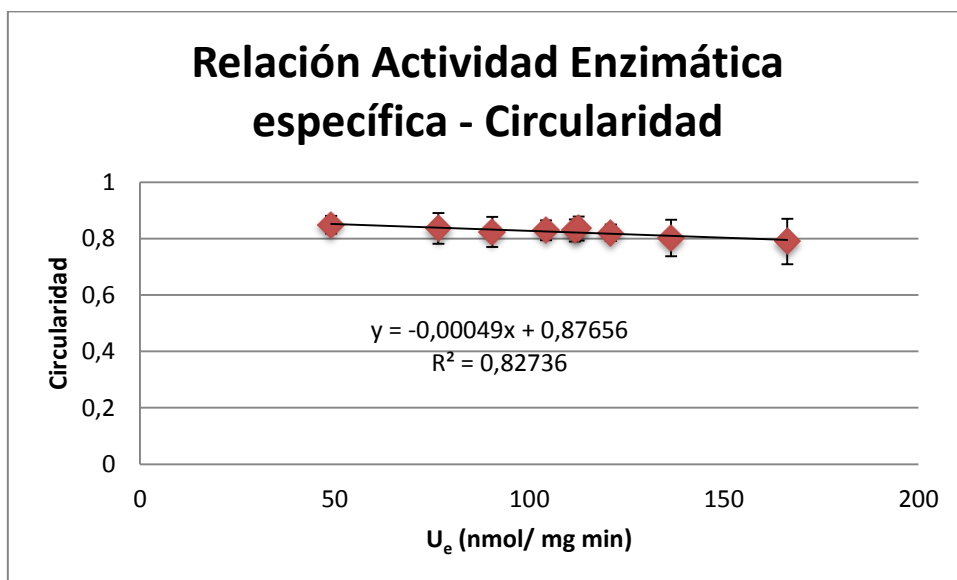


Figura 31. Relación entre la actividad enzimática específica de la Poligalacturonasa con el Diámetro de Feret celular.

Se ha encontrado que los cambios morfogeométricos son uno de los principales factores relacionados con parámetros de firmeza como turgencia e integridad de la pared celular (Trejo Araya, Hendrickx, Verlinden, Van Buggenhout, Smale, Stewart, et al., 2007). El encogimiento celular es uno de los fenómenos que se ha correlacionado con cambios estructurales en manzana (Lewicki & Porzecka-Pawlak, 2005), uvas (Ramos, Silva, Sereno, & Aguilera, 2004) y calabaza (Mayor, Pissarra, & Sereno,

2008). En el presente estudio de papaya fresca precortada todas las relaciones evaluadas muestran que el incremento de la actividad enzimática conduce a un deterioro de la estructura, siendo este cambio lineal y directamente proporcional

En la tabla 2 se relacionan los parámetros evaluados con sus coeficientes de correlación y determinación, además de la pendiente que indica tasas de cambio inversamente proporcionales a la actividad enzimática.

Para corroborar estos resultados se propuso evaluar estadísticamente las relaciones encontradas y con éstas hallar un modelo que describa el fenómeno. Todas relaciones explican fenoménicamente en términos biológicos el ítem 6.12.

Tabla 2. Coeficientes de determinación y correlación hallados en las relaciones actividad enzimática específica vs característica morfoestructural.

Característica Morfoestructural	Coficiente de determinación R2	Coficiente de correlación R	Pendiente
Área	0,929	0,964	-15.755
Perímetro	0,886	0,941	-0.2889
A/P	0,974	0,987	-0.0314
Diámetro Ferret	0,898	0,948	-0.112
Circularidad	0,827	0,909	-0.00049

6.9 Evaluación estadística de las correlaciones

Teniendo en cuenta que cada ensayo contó con 20 réplicas se compararon los 120 datos obtenidos, empleando un diseño completamente al azar con las siguientes variables de respuesta: repetición, Área, perímetro, circularidad, Ferret, Relación de aspecto AR, redondez, últimos que muestran cuan esférico es el objeto, solidez, que indica la ausencia de discontinuidades en la superficie y el factor área/ perímetro AP, se aplicó una serie de pruebas aplicando el programa SAS para establecer mejor las relaciones. En términos generales se puede decir que el comportamiento del material si varía con el tiempo con una probabilidad menor a 0.05.

Tabla 3. ANOVA general.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	170.394029	18.932670	3.13	0.0017
Error	170	1029.605971	6.056506		
Corrected Total	179	1200.000000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Tiempo Mean	
	0.141995	61.52492	2.460997	4.000000	

La primera evaluación efectuada fue la determinación del efecto de las réplicas en la variabilidad total del experimento, resultando nulo, pues el valor de la probabilidad fue mayor de 0.05. Las demás variables de manera general presentaron respuesta significativa para la circularidad, el área y la relación área perímetro, en una evaluación conjunta de los datos, que no contradice los resultados presentados en la sección 6.7.

Tabla 4. ANOVA características morfoestructurales y de réplicas

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	1	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000
Área	1	58.71313055	58.71313055	9.69	0.0022
Perímetro	1	39.12892090	39.12892090	6.46	0.0119
Circularidad	1	33.98391850	33.98391850	5.61	0.0190
Feret	1	5.27797294	5.27797294	0.87	0.3519
AR	1	5.75682593	5.75682593	0.95	0.3310
Round	1	11.44097070	11.44097070	1.89	0.1711
Solidity	1	0.48996616	0.48996616	0.08	0.7764
AP	1	15.60232345	15.60232345	2.58	0.1103

Al evaluar todos los atributos se encontró que para una suma de cuadrados tipo III, en la que se calcula la significancia de cada atributo teniendo en cuenta la no interacción entre variables, una parametrización equiparamétrica y se observa cualquier otro efecto que no contenga la variable y de forma independiente a cualquier otro que la contenga (Santana, Camilo, López, & Alberto, 2001). En este caso resultaron significativas para un $P < 0.05$ el área, y la relación área/perímetro. Por tanto estas variables parecen ser las más sensibles al paso del tiempo de exposición.

Tabla 5. Análisis suma de cuadrados tipo III para las características morfoestructurales.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	1	2.31931783	2.31931783	0.38	0.5369
Área	1	79.60049510	79.60049510	13.14	0.0004
Perímetro	1	0.00054063	0.00054063	0.00	0.9925
Circularidad	1	6.45663414	6.45663414	1.07	0.3033
Feret	1	0.00639298	0.00639298	0.00	0.9741
AR	1	14.27147688	14.27147688	2.36	0.1266
Round	1	9.29971612	9.29971612	1.54	0.2170
Solidity	1	1.63999134	1.63999134	0.27	0.6035
AP	1	15.60232345	15.60232345	2.58	0.1103

6.10 Análisis de factores de forma y tamaño por componentes principales.

Para determinar la fuerza de cada uno de los atributos evaluados se aplicó un ensayo de componentes principales. El ensayo pretende encontrar de manera sintética grupos de variables que tengan la mayor incidencia en la variabilidad de las muestras por efecto del tratamiento. La interpretación se efectuó con el software SAS con los siguientes resultados, siendo significativas las relaciones de área con perímetro Ferret, y A/P, así como la circularidad con redondez y solidez:

Tabla 6. Matriz de correlación de componentes principales.

	Correlation Matrix							
	Área	Perímetro	Circularidad	Feret	AR	Round	Solidity	AP
Área	1.0000	0.9385	0.0793	0.8200	-0.0305	0.0100	0.1804	0.9552
Perímetro	0.9385	1.0000	-0.2517	0.9013	0.1327	-0.1419	-0.0991	0.8178
Circularidad	0.0793	-0.2517	1.0000	-0.3063	-0.4946	0.4637	0.8432	0.3487
Feret	0.8200	0.9013	-0.3063	1.0000	0.4849	-0.4961	-0.0678	0.6951
AR	-0.0305	0.1327	-0.4946	0.4849	1.0000	-0.9853	-0.2280	-0.1557
Round	0.0100	-0.1419	0.4637	-0.4961	-0.9853	1.0000	0.2045	0.1273
Solidity	0.1804	-0.0991	0.8432	-0.0678	-0.2280	0.2045	1.0000	0.4017
AP	0.9552	0.8178	0.3487	0.6951	-0.1557	0.1273	0.4017	1.0000

La matriz de los valores relativos de incidencia de las agrupaciones en la variabilidad total de la muestra indican que se obtienen 7 componentes principales, entre los cuales los primeros 2 explican el 82.05%. Los valores individuales de peso en la variabilidad se encuentran en la columna titulada *proportion* y la suma en la columna *Cumulative*.

Tabla 7. Matriz de los valores relativos de incidencia de las agrupaciones en la variabilidad total.

Eigenvalues of the Correlation Matrix				
	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	3.65801121	0.75180492	0.4573	0.4573
2	2.90620629	1.64363785	0.3633	0.8205
3	1.26256844	1.14079173	0.1578	0.9783
4	0.12177671	0.09329967	0.0152	0.9936
5	0.02847703	0.01471250	0.0036	0.9971
6	0.01376453	0.00576160	0.0017	0.9989
7	0.00800294	0.00681008	0.0010	0.9999
8	0.00119286		0.0001	1.0000

Al correlacionar los pesos relativos con las variables evaluadas se encontró que el componente principal 1, con un peso de 45.73% en la variabilidad total, está compuesto de las variables área, perímetro, Ferret; Componente principal 2, factores de forma circularidad, redondez, solidez y A/P con un peso de 36.33%. AR pertenece al componente principal 3. Así entonces, el proceso es complejo y requiere de la evaluación de más de una variable para asegurar la explicación de un estado de senescencia.

Tabla 8. Tabla de pesos de los componentes principales.

The PRINCOMP Procedure								
Eigenvectors								
	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6	Prin7	Prin8
Área	0.409387	0.356212	-.105427	-.075249	-.248401	0.015559	0.781810	-.124766
Perímetro	0.475690	0.160602	-.251959	0.199222	-.289596	0.042799	-.322258	0.674690
Circularidad	-.237972	0.441540	0.385709	-.583150	0.173590	0.055627	0.048890	0.473244
Feret	0.510647	0.019983	0.079803	0.111373	0.845192	-.073519	0.016146	0.007283
AR	0.299692	-.372905	0.455129	-.098132	-.138495	0.730996	0.001795	-.028550
Round	-.300419	0.358374	-.476028	0.188666	0.251899	0.673933	0.008635	-.037480
Solidity	-.132032	0.395394	0.578939	0.695576	-.078196	-.026815	0.006679	-.018891
AP	0.302046	0.477637	0.036693	-.270426	-.145602	0.012909	-.531178	-.550126

Al graficar el componente principal 1 y el componente principal 2 se observa la distribución de variables en dos grandes grupos de factores de forma y de tamaño que permitiría facilitar el análisis:

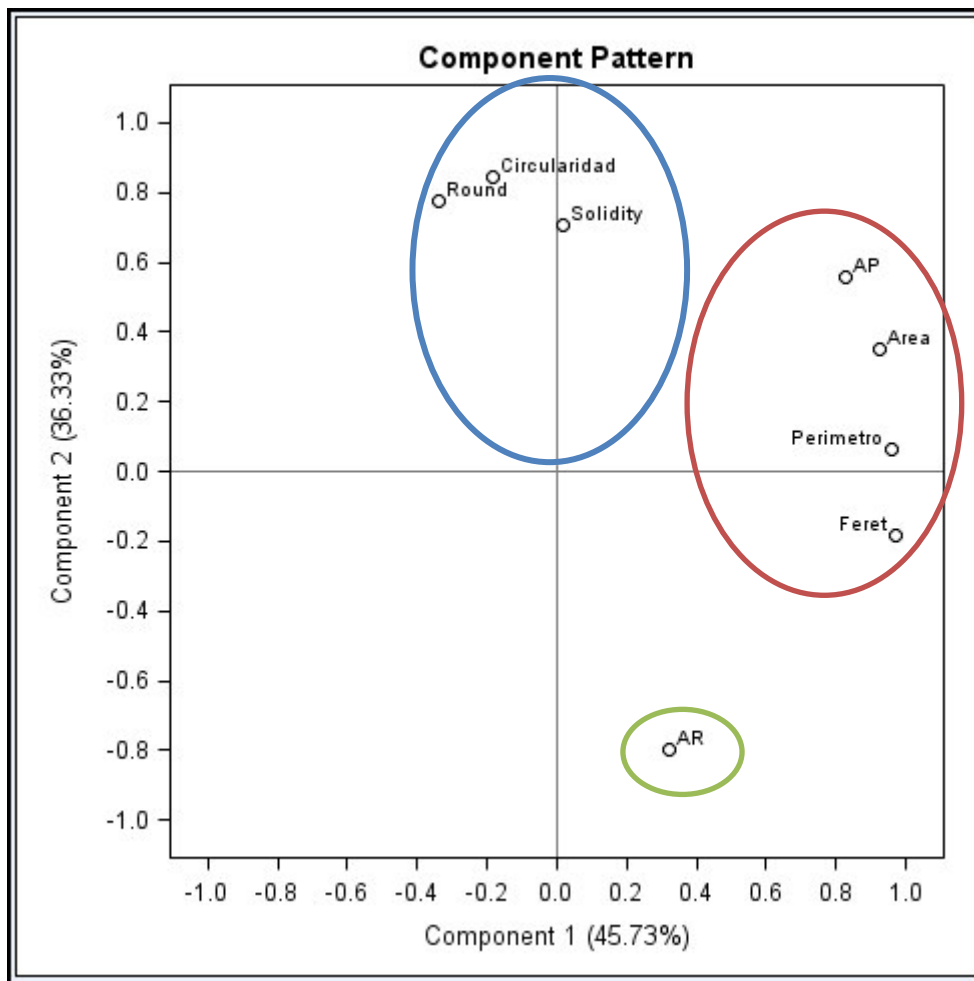


Figura 32. Gráfica de Componentes Principales.

La siguiente grafica muestra el diagrama de dispersión para todos los datos, de forma tal que la evaluación de las variables establecidas no es suficiente de manera independiente para aclarar la variabilidad total.

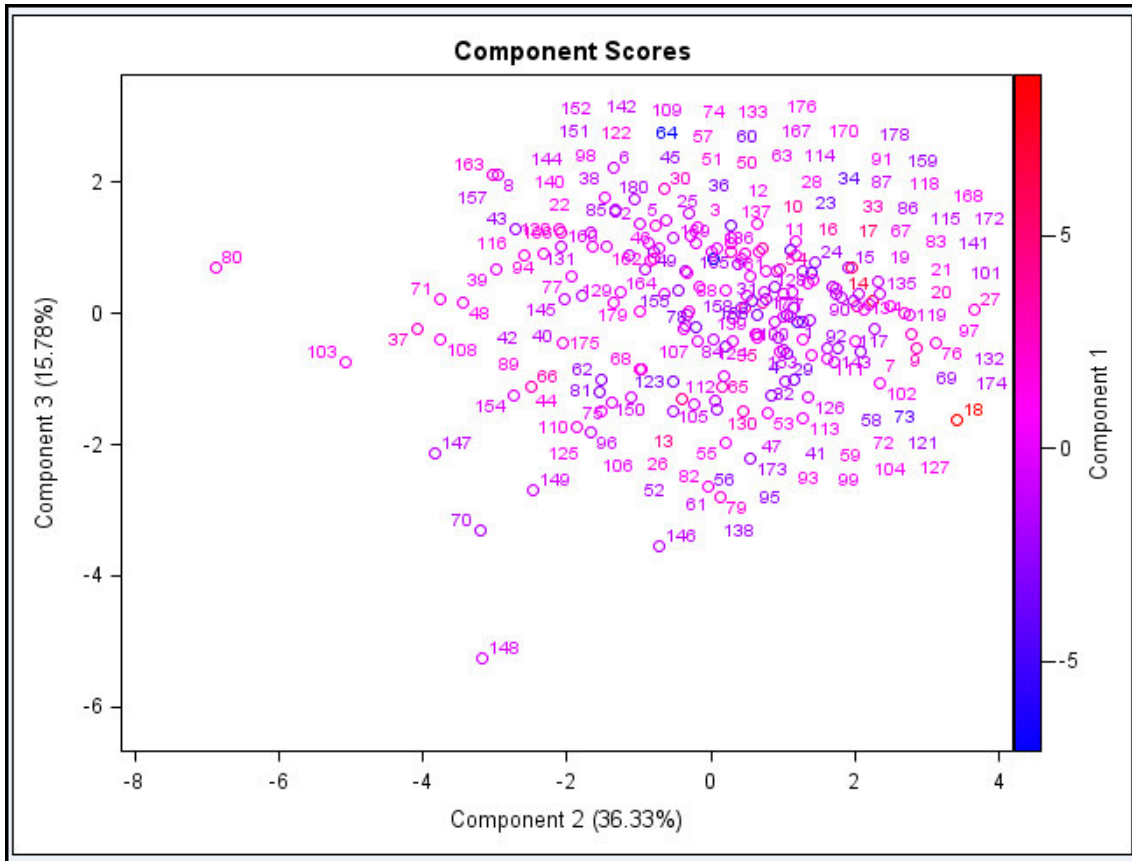


Figura 33. Dispersión de los datos de Componentes Principales

6.11 Construcción del modelo

Teniendo en cuenta que las relaciones presentadas en la sección 6.7 indican que existe una correlación lineal inversa entre los factores de tamaño área, perímetro, A/P, y Feret, y el factor de forma circularidad respecto de la actividad enzimática de la PG, se planteó la búsqueda de un modelo que describa mejor esta relación

Para ello se evaluó la correlación de los parámetros evaluados y se encontró que los coeficientes eran significativos para todas las variables excepto para AR y Redondez:

Tabla 9. Matriz de correlación del modelo.

Correlation Matrix									
	AEnzim	Área	Perímetro	Circularidad	Feret	AR	Round	Solidity	A/P
AEnzim	1.0000	-.8752	-.8002	-.9122	-.8258	-.1038	0.0736	-.8187	-.9186
Área	-.8752	1.0000	0.9824	0.7736	0.9655	0.1531	-.1325	0.7414	0.9843
Perímetro	-.8002	0.9824	1.0000	0.6572	0.9435	0.1208	-.0820	0.6250	0.9458
Circularidad	-.9122	0.7736	0.6572	1.0000	0.7658	0.1305	-.1656	0.9268	0.8658
Feret	-.8258	0.9655	0.9435	0.7658	1.0000	0.3560	-.3375	0.7355	0.9562
AR	-.1038	0.1531	0.1208	0.1305	0.3560	1.0000	-.9708	0.2431	0.1324
Round	0.0736	-.1325	-.0820	-.1656	-.3375	-.9708	1.0000	-.3308	-.1260
Solidity	-.8187	0.7414	0.6250	0.9268	0.7355	0.2431	-.3308	1.0000	0.8153
A/P	-.9186	0.9843	0.9458	0.8658	0.9562	0.1324	-.1260	0.8153	1.0000

Al agrupar por componentes principales se encontró que la variabilidad esta descrita en un 90.51% por los componentes 1 y 2. El componente uno representa el 69% de la variabilidad, incluyendo el área, el perímetro, la circularidad, A/P y Feret, representado por los factores de forma Ar y redondez respecto del 21.5% que representa el segundo componente.

Tabla 10. Matriz de los valores relativos de incidencia de las agrupaciones en la variabilidad total del modelo.

Eigenvalues of the Correlation Matrix				
	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	6.21013870	4.27475564	0.6900	0.6900
2	1.93538306	1.28414267	0.2150	0.9051
3	0.65124039	0.51170503	0.0724	0.9774
4	0.13953535	0.08831811	0.0155	0.9929
5	0.05121725	0.04278290	0.0057	0.9986
6	0.00843435	0.00547875	0.0009	0.9995
7	0.00295559	0.00186028	0.0003	0.9999
8	0.00109531	0.00109531	0.0001	1.0000
9	0.00000000		0.0000	1.0000

Tabla 11. Tabla de pesos de componentes principales del modelo.

	Pr in1	Pr in2	Pr in3	Pr in4	Pr in5
AEzim	- .372954	- .126751	0.192366	0.710381	0.435035
Área	0.386278	0.093824	0.281677	0.102411	- .144867
Perímetro	0.363148	0.116168	0.478063	0.136483	- .209309
Circularidad	0.359166	0.064510	- .509314	- .148453	0.598335
Feret	0.385638	- .060676	0.295039	0.069708	0.441536
AR	0.109250	- .682489	0.104150	- .322576	- .036203
Round	- .109298	0.688745	0.039676	- .176814	0.029381
Solidity	0.349341	- .049746	- .535486	0.547126	- .410087
AP	0.395196	0.105635	0.097435	0.068414	0.150479

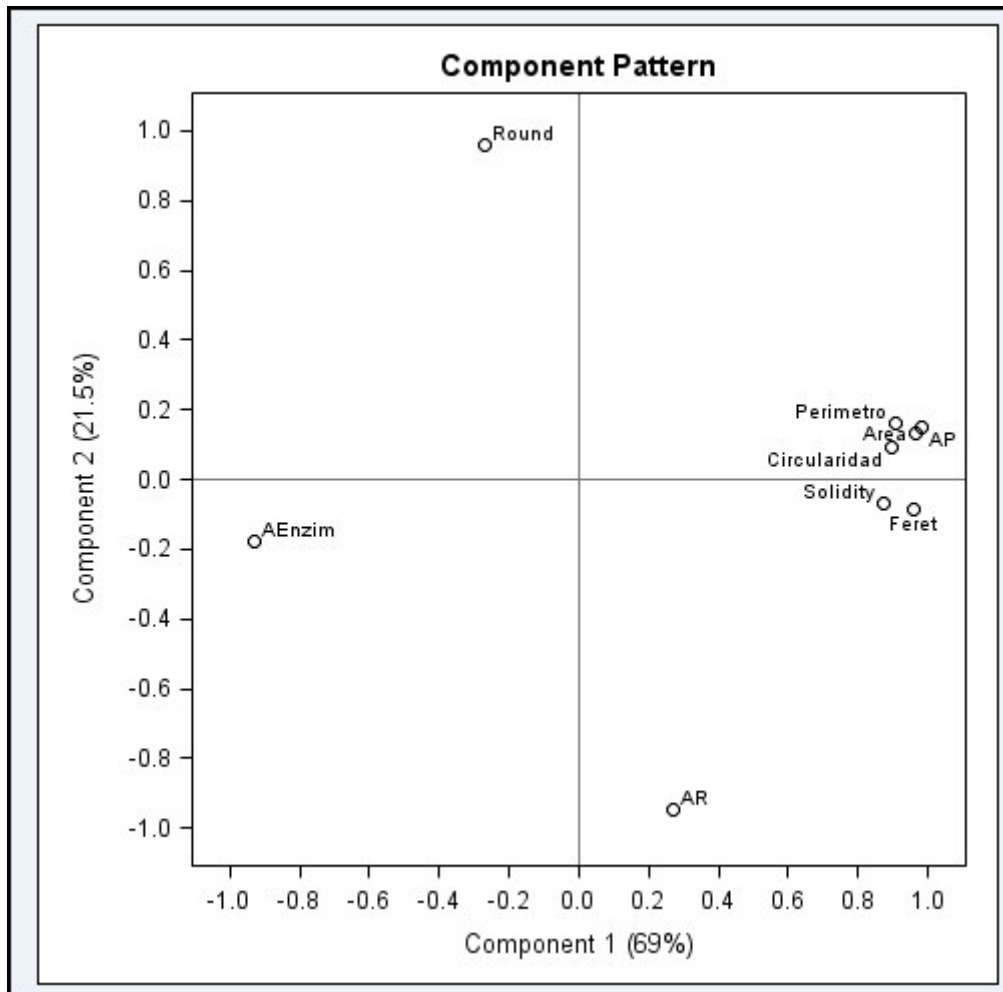


Figura 34. Gráfica de Componentes Principales del modelo.

El modelo encontrado no satisface las pruebas de calidad, puesto que entre otros indicadores el coeficiente de determinación resulto inferior a 0.95, aspecto que incrementa la variabilidad. De acuerdo con la figura 34, todos los atributos de tamaño, forma e irregularidad se pueden reducir a Perímetro, Circularidad y A/P, pero estos no explican la variabilidad de la relación de aspecto y redondez, atributos que pertenecen al PCC 2.

El modelo encontrado fue el siguiente:

$$AEnzim = 7897.7 - 22.342Perímetro - 8849.4Circularidad + 315.12AP$$

$$R^2 = 0.9444$$

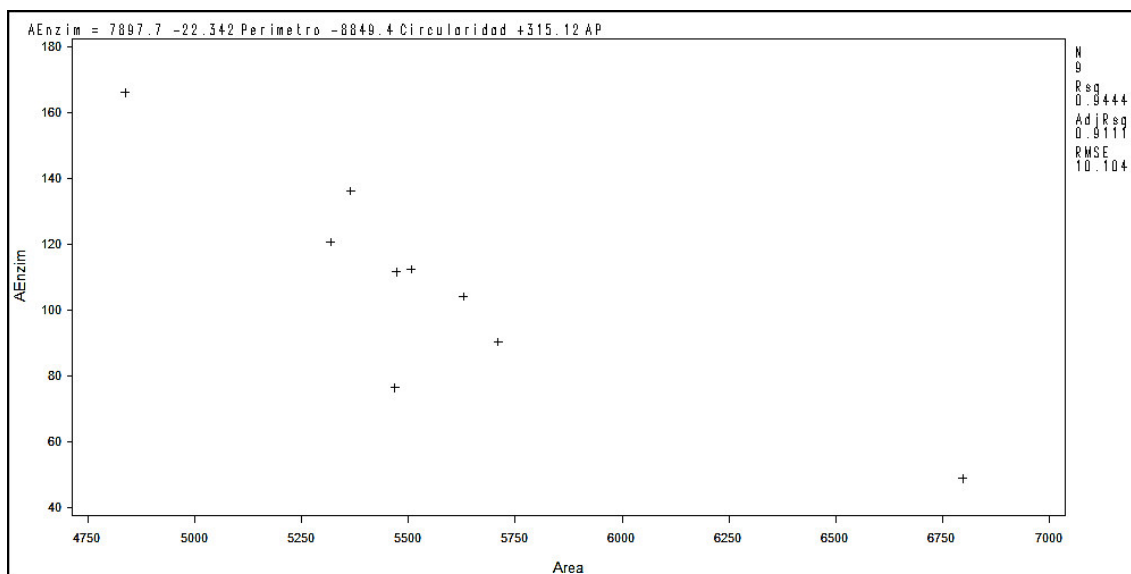


Figura 35. Modelo preliminar calculado.

Se hizo necesario explorar otras alternativas para lograr un modelo más robusto que lleve a una posible predicción del estado de avance de la senescencia en función de los atributos de forma, tamaño y actividad enzimática.

Teniendo en cuenta los resultados se ajustó nuevamente el modelo empleando el procedimiento Procreg con la herramienta selection=stepwise del software SAS. La variable AP indicó ser la más sensible a la actividad enzimática, aspecto que coincide con ser la variable más sensible al cambio por efecto del tiempo. El modelo final con la mejor aproximación se muestra en la figura 36 donde:

$$AP (\mu\text{m}) = 22.79 - 0.0331 A_{Enz} (\text{nmol/mg} \cdot \text{min})$$

Al evaluar el modelo frente a los valores experimentales hay coincidencia por diversos test de ajuste. Los resultados de las pruebas de ajuste se encuentran resumidos en la figura 38. El modelo, que cumple con confirmar la hipótesis planteada, no explica el comportamiento de las variables en el tiempo.

De la figura 36 se puede decir que el parámetro A/P depende de la actividad enzimática, por lo que se puede concluir que es posible predecir el cambio en la

actividad enzimática a partir de las variaciones de los atributos morfogeométricos, con la siguiente ecuación:

$$A_{\text{Enz}} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg min}} \right) = 688.51 - 30.21AP (\mu\text{m})$$

De manera cualitativa se observa que al incrementar la actividad de la PG se disminuye la relación Área/ perímetro, debido a que el contorno celular y el área cambian por la reducción de los elementos estructurales que se hidrolizan, aspecto que ha sido evidenciado en otros estudios (Casas-Forero & Cález-Rámirez, 2011; Oey, Vanstreels, De Baerdemaeker, Tijssens, Ramon, Hertog, et al., 2007). Sin embargo, la tasa de cambio del área que siendo mayor a la del perímetro conduce a la reducción de la relación, aspecto que se observa en la tabla 2. Otro hallazgo interesante, se relaciona el mantenimiento de los parámetros forma, con mínimos cambios en el periodo evaluado para la redondez, AR y solidez. La circularidad está directamente vinculada con la relación área perímetro y muestra cambio en el tiempo. Probablemente para un período más corto en la frecuencia de observación sería posible observar cambios drásticos en los atributos de forma. Sin embargo, la tasa de cambio es decreciente en todas las variables afectadas y es posible que se llegue a un comportamiento asintótico.

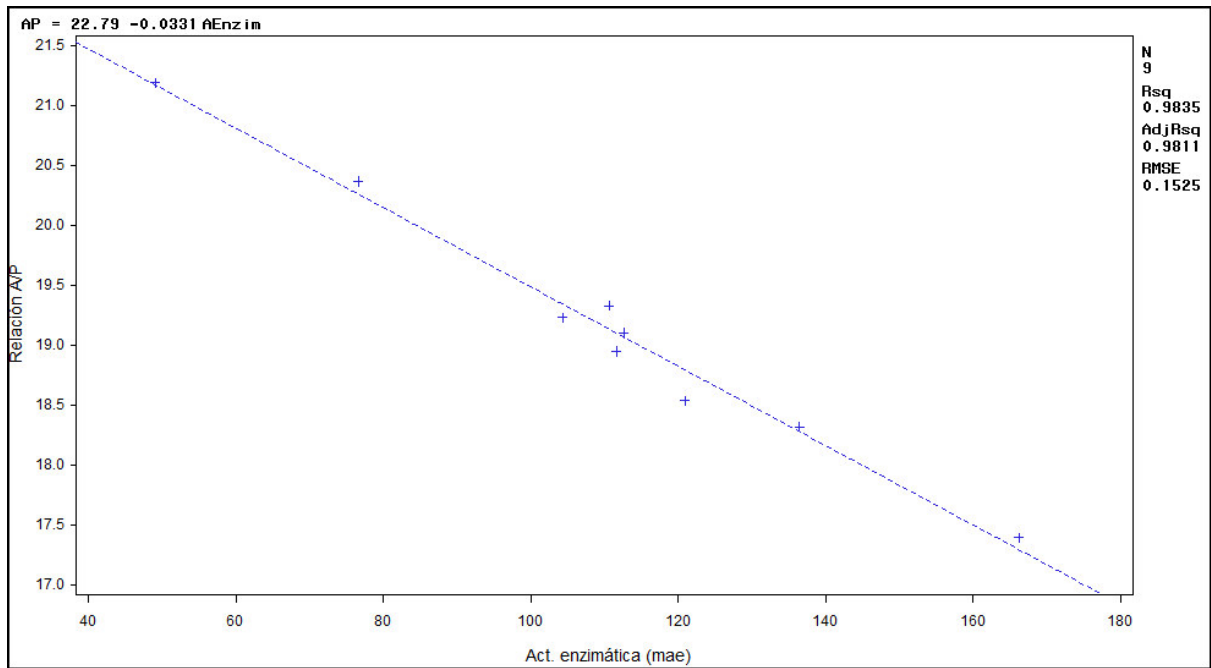


Figura 36. Modelo final calculado

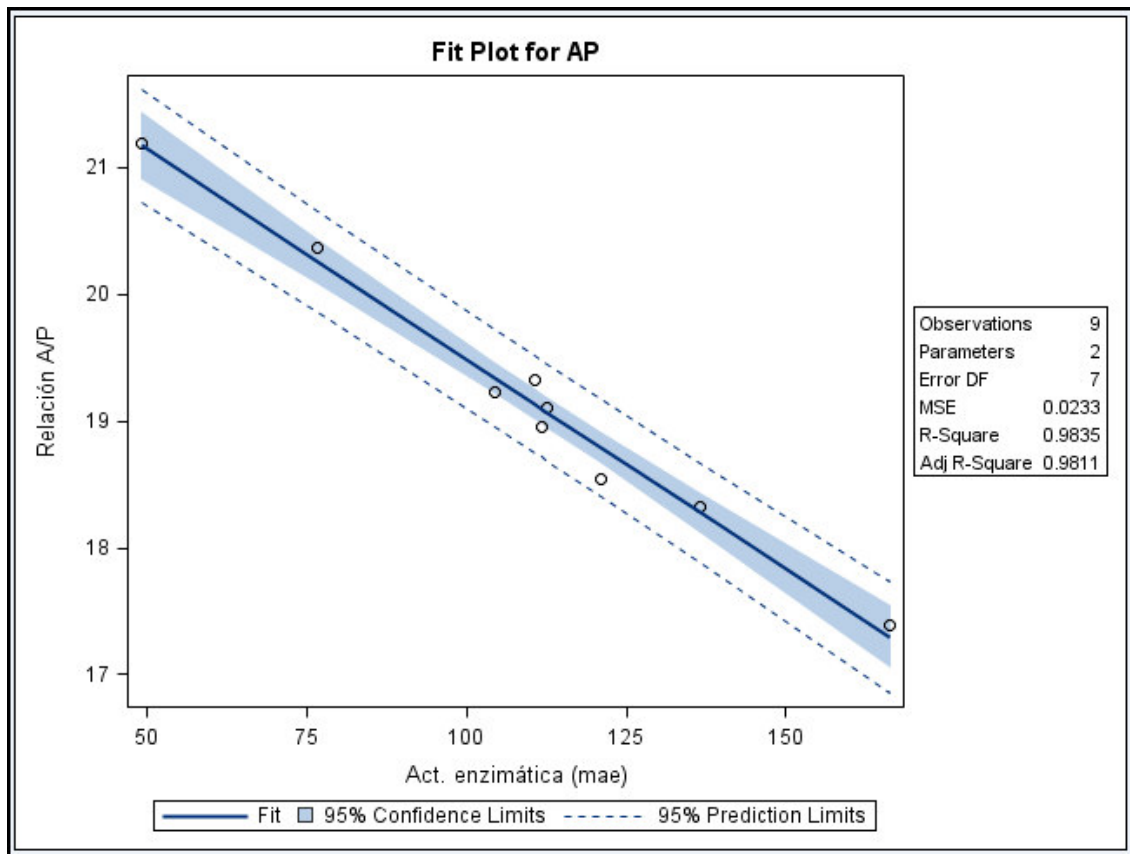


Figura 37. Ajuste del modelo final

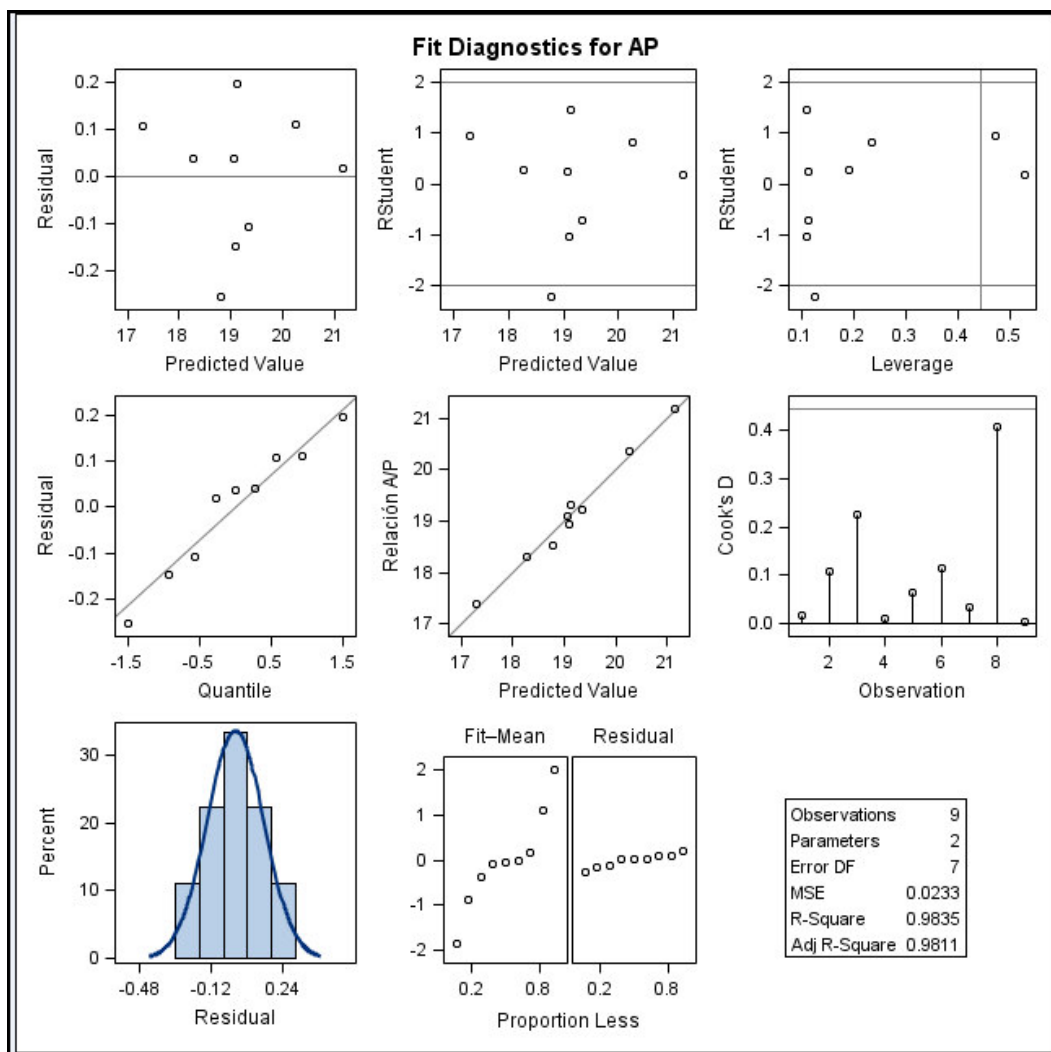


Figura 38. Resumen del diagnóstico de ajuste para el modelo final.

6.12 Estructura y actividad enzimática

Debido a la complejidad del proceso de ablandamiento se requiere establecer un acercamiento a lo que podría ser la ruta degradativa de estas estructuras. Los polisacáridos asociados a las paredes celulares tienen un considerable potencial de modulación estructural y la pectina está asociada a un complejo sistema de regulación de esta estructura y sus propiedades de ensamblaje, adhesión celular y crecimiento de las células, así como a la respuesta a factores bióticos o abióticos de estrés celular, debido a su posibilidad de ser metilada por esterificación y acetilada (Pelloux, Rustérucchi, & Mellerowicz, 2007).

El conjunto de enzimas asociados a la modificación de las pectinas incluye las PG, pectatolysas, PME y sus inhibidores asociados, actúan para modificar la pared celular y la estructura de estos polímeros. Los genes promotores de dichas proteínas han sido identificados en numerosas especies, pero aún se ve lejana la comprensión de su mecanismo de acción teniendo en cuenta el proceso de señalización celular y la complejidad de las estructuras de estos polisacáridos (Wolf, Mouille, & Pelloux, 2009). En el tomate se ha encontrado una diversidad de patrones estructurales de hemicelulosa responsables de la adhesión celular (Ordaz-Ortiz, Marcus, & Knox, 2009). Las estructuras varían en función de las necesidades celulares relacionados con el entrecruzamiento de la celulosa y de los demás glicanos presentes, además de tener funciones adicionales, aun no descritas (Lee, Marcus, & Knox, 2011). El estudio de los genes que se requieren para el control de la síntesis y modificación de estos polisacáridos asociados a pared celular y lámina media han sido reportados en *Arabidopsis Thaliana* (Chivasa, Ndimba, Simon, Robertson, Yu, Knox, et al., 2002), así genes asociados a la glicosiltransferasa en pared celular (Egelund, Skjøt, Geshi, Ulvskov, & Petersen, 2004). En papaya apenas se inicia el camino con herramientas de genómica y proteómica (Nogueira, Labate, Gozzo, Pilau, Lajolo, & Oliveira do Nascimento, 2012).

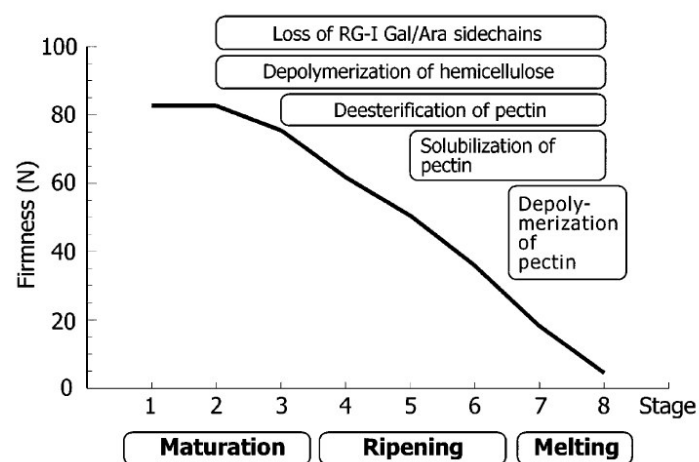


Figura 39. Pérdida de firmeza de las frutas debido a diversos cambios en la pared celular. (Hodges & Toivonen, 2008)

La figura 39 muestra una tendencia decreciente de la firmeza entre el estado de maduración 1, 2 y 3, que corresponden al inicio del amarillamiento del fruto y a la finalización del crecimiento involucran la reacciones de depolimerización de la hemicelulosa por las xilanasas y la pérdida de cadenas laterales arabinanos y arabinogalactanos por acción de las β -Galactosidasas; seguido por el estado de maduración apreciable por el incremento en el área amarillo-naranja sobre el fruto con reacciones de desesterificación de la pectina por acción de la PME y solubilización de la misma por la PG; y finalmente la sobremaduración que conlleva al ablandamiento debido a la depolimerización de la pectina. Esa tendencia decreciente es inversamente proporcional al avance de la senescencia.

Hay relaciones evidentes entre los cambios morfoestructurales y la actividad de la PG que podrían ser de gran utilidad. Probablemente se requiera de la selección de otros atributos de imagen más fácilmente observables o que presenten mejores correlaciones con el tiempo, y el empleo de métodos de evaluación para explorar fenómenos no lineales. Para ello habría que estudiar técnicas como la macrovisión con esteroscopía, el empleo de microscopía de alta definición, y otras técnicas más sensibles para profundizar la relación entre la estructura, los cambios moleculares y la integridad celular (Chassagne-Berces, Poirier, Devaux, Fonseca, Lahaye, Pigorini, et al., 2009).

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que el trabajo obedece a la validación de la hipótesis planteada de la posibilidad de encontrar una relación entre la actividad enzimática de la Poligalacturonasa con los atributos morfoestructurales celulares de la papaya (*Carica papaya* L.) en función del avance de la senescencia, se puede concluir que:

- Existe una relación lineal inversa de la firmeza con los sólidos solubles totales con una tasa de cambio de 9.437 N por cada 1% de incremento en SST a medida que avanza el estado de madurez de la papaya.
- Se determinó que el grado de madurez apropiado para la evaluación de la actividad de la poligalacturonasa corresponde al grado seis (90-100% madurez) teniendo en cuenta que en este estado se produjo el máximo ablandamiento para la variedad de papaya evaluada.
- La electroforesis 2D realizada mostró una aparente poligalacturonasa de 29 kDa y un punto isoeléctrico en un rango entre 9 y 10 que no ha sido reportada por otros autores.
- Se lograron calcular los parámetros afinidad y Velocidad máxima para la de poligalacturonasa del extracto crudo, obteniendo valores de K_m 0.0051 mg/ml y $V_{m\acute{a}x}$ 0.06532 nmol ácido poligalacturónico s^{-1} respectivamente lo cual indica la alta afinidad de la endopoligalacturonasa encontrada con el ácido poligalacturónico.
- La confirmación de la presencia de la poligalacturonasa efectuada por RT-PCR indica que esta enzima corresponde a una endopoligalacturonasa 248 pb descrita para la misma fruta en la base de datos NCBI.
- La expresión relativa de la poligalacturonasa presentó una relación lineal con la actividad enzimática de la misma enzima, con una pendiente de 1.182 y un R^2 de 0.999 durante el avance de la senescencia.

- Los parámetros morfoestructurales de tamaño celular (área, perímetro, diámetro de Ferret) pudieron ser relacionados con la actividad de la poligalacturonasa durante el avance de la senescencia, obteniendo valores de coeficientes de determinación entre 0.929, 0.886 y 0.898 respectivamente. El atributo de forma más significativo fue la circularidad ($R^2= 0.827$). El mejor descriptor morfométrico resultó ser la relación A/P como indicador de la irregularidad inversamente relacionado con la actividad de la poligalacturonasa con un R^2 de 0.974.
- Se agruparon las características morfoestructurales en dos componentes principales, donde el primero representó el 69% de la variabilidad incluyendo solamente factores de tamaño mientras que el segundo incluyó solo factores de forma y representó el 21.5%. Teniendo en cuenta que la actividad enzimática se encuentra en el PCC 1, sería de esperarse que los atributos de tamaño puedan emplearse para predecir la actividad enzimática.
- El modelo encontrado $A_{Enz} \text{ nmol}/(\text{mg min})=688.51-30.21A/P \text{ } (\mu\text{m})$ permite predecir la actividad de la poligalacturonasa en función de la relación A/P ($R^2=0.9835$).

Como conclusión general, la combinación de una observación multinivel genómico, proteómico y estructural puntualizada en la evaluación de cambios de actividad enzimática, en la expresión génica y en los parámetros morfoestructurales celulares permitió evidenciar que los cambios a nivel molecular se reflejan en cambios morfométricos de células de papaya fresca precortada por efecto del avance de la senescencia.

El aporte de este trabajo se centra en que al mostrar relaciones entre la actividad enzimática de la PG y los parámetros morfoestructurales celulares ha abierto el

camino para continuar en la profundización de alternativas focalizadas a la minimización de las causas del ablandamiento durante el almacenamiento de la papaya fresca precortada

RECOMENDACIONES

- Para poder escalar el trabajo desarrollado a estudio de vida útil resulta indispensable realizar estudios en periodos de tiempo más largos a temperaturas más bajas con condiciones de empaque establecidas, para encontrar la equivalencia con un modelo predictivo para papaya fresca precortada.
- Este estudio puede servir como modelo para analizar el avance de la senescencia en otros estados de madurez de la papaya, o en frutas donde la firmeza sea un factor fundamental en la calidad.
- La proteómica en papaya se encuentra en sus inicios, y las posibilidades de encontrar diversas enzimas asociadas a la modificación de polisacáridos de pared celular es latente, por tanto podría ser una línea de estudio interesante.
- La relación de la expresión de la poligalacturonasa con la actividad durante la senescencia abre la posibilidad de estudiar no solamente la enzima como respuesta a la madurez de la fruta sino también como respuesta a un tipo de estrés generado a las células.
- Probablemente se requiera de la selección de otros atributos de imagen más fácilmente observables o que presenten mejores correlaciones con el tiempo, y el empleo de métodos de evaluación para explorar fenómenos no lineales, así se puede enriquecer el modelo hallado con variables independientes como textura y color.

REFERENCIAS

- Ali, Z. M., & Brady, C. J. (1982). Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruits. *Functional Plant Biology*, 9(2), 155-169.
- Ali, Z. M., Chin, L.-H., & Lazan, H. (2004). A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, 167(2), 317-327.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21-28.
- Alonso Esquivel, M., Tornet, Y., Aranguren, M., Ramos, R., Rodríguez, K., & Pastor, M. C. R. (2008). Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo solo, introducidos en Cuba. *Agronomía costarricense*, 32(2), 169.
- Alonso Esquivel, M., Tornet, Y., Ramos, R., Farrés, E., & Rodríguez, D. (2009). Evaluación de dos híbridos de papaya introducidos en Cuba. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 33(2), 267-274.
- Amnuaysin, N., Jones, M. L., & Seraypheap, K. (2012). Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas. *Scientia Horticulturae*, 142, 98-104.
- Arango, L., Román, C., Salamanca, C., Almansa, E., Bernal, R., León, G., Valenzuela, V., Ariza, M., & Bilbao, P. (2000). El cultivo de la papaya en los Llanos Orientales de Colombia. *Corpoica. Manual de asistencia técnica. Villavicencio, Colombia*.
- Arenas-Ocampo, M., Alamilla-Beltrán, L., Vanegas-Espinoza, P. E., Camacho-Díaz, B. H., Campos-Mendiola, R., Gutiérrez-López, G., & Jiménez-Aparicio, A. (2012). Fractal morphology of Beta vulgaris L. cell suspension culture permeabilized with Triton X-100®. *International Agrophysics*, 26(1), 1-6.
- Armstrong, F. B., & Bennett, T. P. (1982). *Bioquímica*: Reverté.
- Asif, M. H., & Nath, P. (2005). Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2), 177-184.
- Atkinson, R. G., Sutherland, P. W., Johnston, S. L., Gunaseelan, K., Hallett, I. C., Mitra, D., Brummell, D. A., Schroder, R., Johnston, J. W., & Schaffer, R. J. (2012). Down-regulation of POLYGALACTURONASE 1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biology*, 12(1), 129.
- Bach, E., & Schollmeyer, E. (1992). An ultraviolet-spectrophotometric method with 2-cyanoacetamide for the determination of the enzymatic degradation of reducing polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 203(2), 335-339.
- Bhande , S. D., Ravindra , M. R., & Goswami, T. K. (2008). Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. *Journal of Food Engineering*, 87, 116-123.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., & Pech, J. (2010). Mechanism of Fruit Ripening. *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, 319-339.
- Brummel, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *plant molecular biology*, 311-340.
- Brummel, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2029-2039.
- Brummel, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B., & Dunsmuir, P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening

- and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell Online*, 11(11), 2203-2216.
- Carmona, M. R., Aguilera, M., Pérez, C. A., & Serey, I. (2006). Actividad respiratoria en el horizonte orgánico de suelos de ecosistemas forestales del centro y sur de Chile. *Gayana Bot*, 63, 1.
- Carpita, N. C. (1987). *The biochemistry of "growing" cell walls*. In *Physiology of Cell Expansion During Plant Growth* (Cosgrove, D.J. and Knievel, D.P., eds.) Rockville, M.D.: Am. Soc. Plant Physiol.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- Casas-Forero, N., & Cález-Rámirez, G. (2011). Morfometric and quality changes by application of three calcium sources under mild thermal treatment in pre-cut fresh melon (*Cucumis melo* L.). *Cambios morfométricos y de calidad por aplicación de tres fuentes de calcio bajo tratamiento térmico suave en melón (Cucumis melo L.) fresco precortado*, 10(3), 431-444.
- Chan Jr, H. T., & Tam, S. Y. T. (1982). Partial Separation and Characterization of Papaya Endo-and Exo-Polygalacturonase. *Journal of Food Science*, 47(5), 1478-1483.
- Chassagne-Berces, S., Poirier, C., Devaux, M.-F., Fonseca, F., Lahaye, M., Pigorini, G., Girault, C., Marin, M., & Guillon, F. (2009). Changes in texture, cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing. *Food Research International*, 42(7), 788-797.
- Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Robertson, D., Yu, X. L., Knox, J. P., Bolwell, P., & Slabas, A. R. (2002). Proteomic analysis of the Arabidopsis thaliana cell wall. *Electrophoresis*, 23(11), 1754-1765.
- de Assis Zampirolli, F., Stransky, B., Lorena, A. C., & de Melo Paulon, F. L. (2010). Segmentation and classification of histological images-application of graph analysis and machine learning methods. In *Graphics, Patterns and Images (SIBGRAPI), 2010 23rd SIBGRAPI Conference on*, (pp. 331-338): IEEE.
- de Oliveira, J. G., & Vitória, A. P. (2011). Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview. *Food Research International*, 44(5), 1306-1313.
- Dowd, J. E., & Riggs, D. S. (1965). A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chem*, 240(2), 863-869.
- Egelund, J., Skjøt, M., Geshi, N., Ulvskov, P., & Petersen, B. L. (2004). A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes. *Plant physiology*, 136(1), 2609-2620.
- ElMasry, G., Wang, N., ElSayed, A., & Ngadi, M. (2007). Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 98-107.
- Fabi, J. P., Cordenunsi, B. R., Seymour, G. B., Lajolo, F. M., & do Nascimento, J. R. O. (2009). Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11-12), 1075-1081.
- Fabi, J. P., Lajolo, F. M., & Nascimento, J. R. O. d. (2009). Cloning and characterization of transcripts differentially expressed in the pulp of ripening papaya. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 159-165.
- Fabi, J. P., Mendes, L. R. B. C., Lajolo, F. M., & do Nascimento, J. R. O. (2010). Transcript profiling of papaya fruit reveals differentially expressed genes associated with fruit ripening. *Plant Science*, 179(3), 225-233.

- Facco, P., Masiero, A., Bezzo, F., Barolo, M., & Beghi, A. (2011). Improved multivariate image analysis for product quality monitoring. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*.
- FAO. (2002). *El Cultivo protegido en clima mediterráneo*: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernandez, L., Castellero, C., & Aguilera, J. (2005). An application of image analysis to dehydration of apple discs. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 185-193.
- Fischer, C. (2009). Opportunities for Innovation in Fruit & Vegetable Retailing: A Value Chain Approach. In M. University (Ed.), *19th Annual World Forum and Symposium*, (pp. 1-22). Budapest, Hungary: IAMA.
- Flanzy, C. (2002). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*: AMV Ediciones.
- Fry, S. C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*: Longman Scientific & Technical.
- Fuggate, P., Wongs-Aree, C., Noichinda, S., & Kanlayanarat, S. (2010). Quality and volatile attributes of attached and detached 'Pluk Mai Lie' papaya during fruit ripening. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 120-129.
- García, A. R., Balbín, M. I., Cabrera, J. C., & Castelvi, A. (2002). Actividad endopoligalacturonasa de un preparado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada de la pulpa del café. *Cultivos Tropicales*, 23(1), 67-72.
- Gil, A. I., & Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (Carica papaya L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 217-222.
- Gleason, F., & Chollet, R. (2011). *Plant Biochemistry*: Jones & Bartlett Learning.
- 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.
- Gross, K. C. (1982). A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience*, 17, 933-934.
- Hadfield, K. A., & Bennett, A. B. (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117(2), 337-343.
- Hadfield, K. A., Rose, J. K. C., Yaver, D. S., Berka, R. M., & Bennett, A. B. (1998). Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiology*, 117(2), 363-373.
- HITM, H. I. o. T. a. M. (2006). Food HACCP Processes. In *4-food-HACCP-4-06*. Minneapolis, USA.
- Hobson, G. E. (1965). The firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *J. Hort. Sci*, 40, 66-72.
- Hodges, M., & Toivonen, P. (2008). Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by abiotic stress. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 155-162.
- ICONTEC. (1993). Industria alimentaria: papaya. In ICONTEC (Ed.), *NTC*, vol. 1270. Bogotá D.C: ICONTEC.
- Jahns, G., Møller Nielsen, H., & Paul, W. (2001). Measuring image analysis attributes and modelling fuzzy consumer aspects for tomato quality grading. *Computers and Electronics in Agriculture*, 31(1), 17-29.
- Karakurt, Y., & Huber, D. J. (2003). Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 28(2), 219-229.
- Lazan, H., Selamat, M. K., & Ali, Z. M. (1995). β -Galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 95(1), 106-112.
- Lee, K. J. D., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (2011). Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Molecular plant*, 4(2), 212-219.

- Lewicki, P. P., & Porzecka-Pawlak, R. (2005). Effect of osmotic dewatering on apple tissue structure. *Journal of Food Engineering*, 66(1), 43-50.
- Lleó, L., Barreiro, P., Ruiz-Altisent, M., & Herrero, A. (2009). Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 229-235.
- Lohani, S., Trivedi, P. K., & Nath, P. (2004). Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, 31(2), 119-126.
- Lu, R. (2007). Nondestructive measurement of firmness and soluble solids content for apple fruit using hyperspectral scattering images. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 1(1), 19-27.
- Lu, R. (2008). Quality evaluation of fruits by hyperspectral imaging. In *Computer vision technology for food quality evaluation*, (pp. 319-348). Burlington, MA: Elsevier.
- López-García, F., Andreu-García, G., Blasco, J., Aleixos, N., & Valiente, J.-M. (2010). Automatic detection of skin defects in citrus fruits using a multivariate image analysis approach. *Computers and Electronics in Agriculture*, 71(2), 189-197.
- Marin, S. L. D., Pereira, M. G., Amaral Júnior, A. T., Martelleto, L. A., & Ide, C. D. (2006). Heterosis in papaya hybrids from partial diallel of Solo and Formosa parents. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6(1), 24-29.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D., Poulton, N. J., Swan, B. K., Gomez, M. L., Masland, D., Sieracki, M. E., & Stepanauskas, R. (2011). Unveiling in situ interactions between marine protists and bacteria through single cell sequencing. *The ISME Journal*.
- Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J., & Seymour, G. B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2115.
- Mayor, L., Pissarra, J., & Sereno, A. M. (2008). Microstructural changes during osmotic dehydration of parenchymatic pumpkin tissue. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 326-339.
- Morales, M. C., & Box, J. M. M. (2005). *Prontuario de Agricultura*: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica.
- Moreda, G. P., Ortiz-Cañavate, J., García-Ramos, F. J., & Ruiz-Altisen, M. (2009). Non-destructive technologies for fruit and vegetable size determination – a review. *Journal of Food Engineering*, 92, 119–136.
- Muchuweti, M., Moyo, E., & Mushipe, S. (2005). Some properties of the polygalacturonase from four Zimbabwean wild fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* and *Berchemia discolor* fruits). *Food Chemistry*, 90(4), 655-661.
- Nogueira, S. B., Labate, C. A., Gozzo, F. C., Pilau, E. J., Lajolo, F. M., & Oliveira do Nascimento, J. R. (2012). Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1428-1439.
- O'Connor-Shaw, R. E., Roberts, R., Ford, A. L., & Nottingham, S. M. (2006). Shelf life of minimally processed honeydew, kiwifruit, papaya, pineapple and cantaloupe. *Journal of Food Science*, 59(6), 1202-1206.
- Oey, M. L., Vanstreels, E., De Baerdemaeker, J., Tijskens, E., Ramon, H., Hertog, M. L. A. T. M., & Nicolai, B. (2007). Effect of turgor on micromechanical and structural properties of apple tissue: A quantitative analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 240-247.
- Ordaz-Ortiz, J. J., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (2009). Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecular plant*, 2(5), 910-921.
- Pathak, N., Mishra, S., & Sanwal, G. G. (2000). Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, 54(2), 147-152.
- Paull, R. E., & Chen, N. J. (1983). Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant physiology*, 72(2), 382-385.

- Paull, R. E., Gross, K., & Qiu, Y. (1999). Changes in papaya cell walls during fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 16(1), 79-89.
- Payasi, A., Mishra, N., Chaves, A., & Singh, R. (2009). Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(2), 103-113.
- Pelloux, J., Rustérucci, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in plant science*, 12(6), 267-277.
- Peng, Y., & Lu, R. (2007). Prediction of apple fruit firmness and soluble solids content using characteristics of multispectral scattering images. *Journal of food engineering*, 82(2), 142-152.
- Pires, T. d. C. R., & Finardi-Filho, F. (2005). Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). *Food Chemistry*, 89(1), 85-92.
- Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 1-19.
- Qing, Z., Ji, B., & Zude, M. (2007). Predicting soluble solid content and firmness in apple fruit by means of laser light backscattering image analysis. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 58-67.
- Ramos, I. N., Silva, C. L. M., Sereno, A. M., & Aguilera, J. M. (2004). Quantification of microstructural changes during first stage air drying of grape tissue. *Journal of Food Engineering*, 62(2), 159-164.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174-181.
- Reyes, R. T., Mesa, J. C. T., Reyes, C. E., Negrette, R. G., & Muñoz, C. A. (2006). *Plan Frutícola Nacional, Valle del Cauca, tierra de frutas*. Santiago de Cali: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MADR Gobernación del Valle del Cauca Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola - FNFH Asociación Hortofrutícola de Colombia-Asohofrucol Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle del Cauca - SAG.
- Riquelme, M. T., Barreiro, P., Ruiz-Altisent, M., & Valero, C. (2008). Olive classification according to external damage using image analysis. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 371-379.
- Riyadi, S., Mustafa, M. M., Hussain, A., & Hamzah, A. (2007). Papaya fruit grading based on size using image analysis. In, (pp. 645-648).
- Rodriguez Castro, J. P., Narvaez Cuenca, C. E., & Restrepo Sanchez, L. P. (2006). Estudio de la actividad enzimática de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*); Polygalacturonase Activity in Yellow Pitaya Peel (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta biol. colomb*, 11(supl, 1), 65-74.
- Rose, J. K. C., Hadfield, K. A., Labavitch, J. M., & Bennett, A. B. (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology*, 117(2), 345.
- Ruggiero, C., Marin, S. L. D., & Durigan, J. F. (2011). Mamão, uma história de sucesso. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(SPE1), 76-82.
- Sadrnia, H., Rajabipour, A., Jafary, A., Javadi, A., & Mostofi, Y. (2007). Classification and analysis of fruit shapes in long type watermelon using image processing. *Int. J. Agric. Biol*, 1, 68-70.
- Santana, C., Camilo, J., López, P., & Alberto, L. (2001). Hipótesis y sumas de cuadrados tipo III y IV un enfoque a través del modelo de medias de celda. *Revista colombiana de estadística*, 24(2), 91.
- Sañudo Barajas, J. A., Siller Cepeda, J., Osuna Enciso, T., Muy Rangel, D., López Álvarez, G., Osuna Castro, J. A., Greve, C., & Labavitch, J. (2008). Solubilización y despolimerización de pectinas durante el ablandamiento de frutos de papaya. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(2), 149-155.

- Seymour, G. B., Colquhoun, I. J., Dupont, M. S., & Parsley, K. R. (1990). Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*, 29(3), 725-731.
- Thumdee, S., Manenoi, A., Chen, N. J., & Paull, R. E. (2010). Papaya fruit softening: role of hydrolases. *Tropical Plant Biology*, 3(2), 98-109.
- Torres, R., Montes, E. J., Pérez, O. A., & Andrade, R. D. (2012). Influencia del Estado de Madurez sobre las Propiedades Viscoelásticas de Frutas Tropicales (Mango, Papaya y Plátano). *Información tecnológica*, 23(5), 115-124.
- Trejo Araya, X. I., Hendrickx, M., Verlinden, B. E., Van Buggenhout, S., Smale, N. J., Stewart, C., & John Mawson, A. (2007). Understanding texture changes of high pressure processed fresh carrots: A microstructural and biochemical approach. *Journal of food engineering*, 80(3), 873-884.
- USDA. (2013). Best practices handling fresh produce in schools. In USDA (Ed.), *National Food Service Management Institute*, vol. 2013). Mississippi, USA.
- Van Buggenhout, S., Sila, D., Duvetter, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: part III—texture engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 105-117.
- Vasu, P., Savary, B. J., & Cameron, R. G. (2012). Purification and characterization of a papaya (*Carica papaya* L.) pectin methylesterase isolated from a commercial papain preparation. *Food Chemistry*, 133(2), 366-372.
- Vesali, F., Gharibkhani, M., & Komarizadeh, M. H. (2011). An approach to estimate moisture content of apple with image processing method. *Australian Journal of Crop Science*, 5(2), 111.
- Villarreal, N. M., Rosli, H. G., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2008). Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 141-150.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*: Médica Panamericana.
- Wilkinson, G. N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochemical Journal*, 80(2), 324.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular plant*, 2(5), 851-860.
- Yang, M., Kpalma, K., & Ronsin, J. (2008). A survey of shape feature extraction techniques. *Pattern Recognition*, 43-90.
- Zheng, C., Sun, D. W., & Zheng, L. (2006). Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection—a review. *Trends in food science & technology*, 17(12), 642-655.

ANEXOS

ANEXO 1. Datos y análisis estadístico por SPSS de la caracterización de los estados de madurez (Firmeza y SST).

Estado de madurez	Firmeza (N)	% Brix
1	24,8210774	7,16666667
2	24,19938827	8,23333333
3	21,5784485	8,86666667
4	20,34861547	8,93333333
5	13,6312512	9,5
6	10,27705747	9,76666667

ANOVA de un factor

Firmeza

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5440759,716	5	1088151,943	11,108	,000
Intra-grupos	1175496,311	12	97958,026		
Total	6616256,027	17			

Firmeza

Tukey B^a

Estado	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6,00	3	1048,6793		
5,00	3	1390,9440	1390,9440	
4,00	3		2076,3893	2076,3893
3,00	3			2201,8825
2,00	3			2469,3253
1,00	3			2532,7630

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANOVA de un factor

Brix

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13,251	5	2,650	90,008	,000
Intra-grupos	,353	12	,029		
Total	13,604	17			

Brix

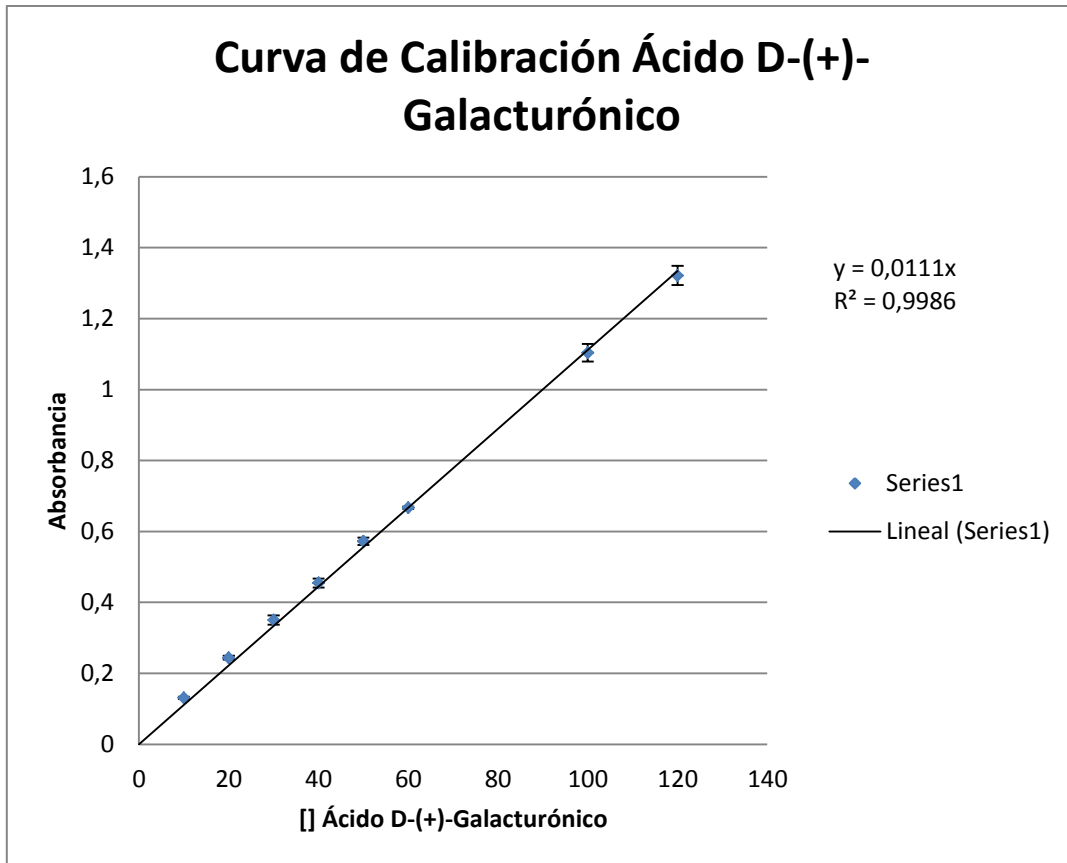
HSD de Tukey^a

Estado	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
1,00	3	7,1667			
2,00	3		8,2333		
3,00	3			8,8667	
4,00	3			8,9333	
5,00	3				9,5000
6,00	3				9,7667
Sig.		1,000	1,000	,996	,445

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXO 2. Curva de calibración del Ácido D-(+)-Galacturónico y Regresión lineal por SPSS.



→ **Regresión**

[Conjunto_de_datos0]

Variables introducidas/eliminadas^a

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Concentración ^b		Introducir

a. Variable dependiente: Absorbancia

b. Todas las variables solicitadas introducidas.

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregido	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
1	,999 ^a	,999	,999	,0135269	,999	19833,300	1	22	,000

a. Variables predictoras: (Constante), Concentración

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	3,629	1	3,629	19833,300	,000 ^b
	Residual	,004	22	,000		
	Total	3,633	23			

a. Variable dependiente: Absorbancia

b. Variables predictoras: (Constante), Concentración

Coefficientes^a

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,025	,005		5,142	,000
	Concentración	,011	,000	,999	140,831	,000

a. Variable dependiente: Absorbancia

ANEXO 3. Datos y análisis estadístico por SPSS de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de ácido poligalacturónico.

[S (mg/mL)	U (nmol/mg s)		
	R1	R2	R3
0,001	0,01638138	0,00765766	0,01201952
0,002	0,01677928	0,01780781	0,01575075
0,003	0,02046547	0,03783784	0,03608108
0,004	0,03768769	0,04003003	0,03954955
0,007	0,03648649	0,0198048	0,03687688
0,01	0,03944444	0,04283784	0,04585586

ANOVA de un factor

U

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,002	5	,000	12,163	,000
Intra-grupos	,000	12	,000		
Total	,003	17			

Subconjuntos homogéneos

U

HSD de Tukey^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
,0010	3	,012019520		
,0020	3	,016779279	,016779279	
,0070	3		,031056056	,031056056
,0030	3		,031461461	,031461461
,0040	3			,039089089
,0100	3			,042712713
Sig.		,920	,093	,241

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXO 4. Datos y análisis estadístico por SPSS de la actividad enzimática a diferentes minutos durante la exposición después de un corte de 5mm de grosor, utilizando ácido poligalacturónico a una concentración de 0,2%.

Tiempo (min)	U (nmol/ mg min)		
	r1	r2	r3
0	31,30766392	40,84143191	75,03998032
30	88,6013986	83,00699301	58,32167832
60	120,5326811	113,9421117	128,3462427
90	161,9113627	128,4124601	119,05587
120	97,01949967	83,86009271	154,1968356
150	50,28735632	122,6675623	98,54082699
180	105,7571965	59,50620093	147,6846058
210	155,0802139	164,5989305	179,2513369
240	118,872267	182,5086306	36,70886076

ANOVA de un factor

U

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27565,774	8	3445,722	2,687	,039
Intra-grupos	23082,614	18	1282,367		
Total	50648,387	26			

Subconjuntos homogéneos

U

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a			
,00	3	49,0630	
30,00	3	76,6434	76,6434
150,00	3	90,4986	90,4986
180,00	3	104,3160	104,3160
120,00	3	111,6921	111,6921
240,00	3	112,6966	112,6966
60,00	3	120,9403	120,9403
90,00	3	136,4599	136,4599
210,00	3		166,3102
Sig.		,131	,114

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXO 5.Datos y análisis estadístico por SPSS de los factores de tamaño y forma a diferentes horas durante la exposición después de un corte de 5mm de grosor.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Área um ²	R1	5006,293	6652,434	4802,149	5197,262	4027,579	5459,75	4811,359	5096,872	5719,475
	R2	4902,343	5888,919	4439,27	4149,152	6416,68	6654,301	6260,108	4852,804	6121,036
	R3	6135,818	3864,546	3766,933	5771,052	6161,56	5234,102	3880,217	5575,797	5521,458
	R4	4172,839	4702,662	6363,261	2031,749	5098,714	6064,854	5585,928	4737,678	5397,121
	R5	4942,252	4825,156	4001,79	7224,406	4165,73	5501,195	5700,134	4667,681	4716,495
	R6	4700,94	6399,157	5571,192	6819,161	4937,537	5636,584	5818,944	5180,684	5920,255
	R7	7651,442	7604,755	5085,82	6046,434	5214,761	5760,92	6586,146	4372,958	5480,012
	R8	4432,713	6192,852	5418,305	6366,024	5868,679	5113,45	5583,165	5149,369	6409,312
	R9	8034,756	4217,291	4404,272	4880,434	6313,527	5403,568	5273,706	4880,434	5226,734
	R10	7840,779	6468,233	6670,879	4456,77	5490,143	6103,536	7275,062	5257,128	6238,925
	R11	6185,008	4862,014	6427,732	5424,752	5813,418	6158,797	4514,793	4641,893	5292,126
	R12	5683,822	4907,144	4663,997	6013,277	4857,409	5463,434	5267,259	4976,22	5585,928
	R13	8201,818	7778,854	6303,396	3538,522	6633,117	6298,791	6183,664	5321,598	4839,91
	R14	10136,026	3602,072	7474,921	5820,786	5697,371	5350,15	6300,633	4945,826	5211,077
	R15	5030,424	7420,581	6249,056	5289,363	4548,871	5185,289	5670,661	4141,784	6024,329
	R16	7756,32	3917,057	4076,392	7386,504	4967,009	5685,398	5275,548	4210,86	5849,337
	R17	9094,672	5734,211	6078,669	5172,395	6444,31	5332,651	6249,056	4488,084	5597,902
	R18	12543,575	4504,662	4236,648	3990,738	5128,186	5934,991	4645,577	4524,924	4797,543
	R19	5952,978	4932,011	6430,495	6970,207	6188,269	6131,167	5732,369	4592,158	5809,734
	R20	7539,139	4896,092	3893,111	4751,493	5460,671	5726,843	5982,884	5130,028	4393,22

ANOVA de un factor

Area					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	43909661,77	8	5488707,721	4,423	,000
Intra-grupos	212222084,7	171	1241064,823		
Total	256131746,5	179			

Subconjuntos homogéneos

Area				
	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	210,00	20	4837,2390	
	60,00	20	5317,9144	
	90,00	20	5365,0241	
	30,00	20	5468,5352	
	120,00	20	5471,6771	
	240,00	20	5507,5965	
	180,00	20	5629,8607	
	150,00	20	5709,9885	5709,9885
	,00	20		6797,1979
	Sig.			,250

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Perímetro (µm)	R1	270,982	306,353	266,336	285,955	254,587	276,864	265,87	268,817	289,545
	R2	273,844	302,418	263,854	258,698	321,283	310,658	312,907	269,652	308,988
	R3	306,599	233,899	245,688	290,203	296,524	304,627	245,552	285,666	301,254
	R4	245,603	258,232	311,164	170,15	280,044	302,515	291,231	269,05	287,023
	R5	272,481	268,255	245,319	335,184	252,338	294,877	309,999	273,451	262,497
	R6	264,677	321,322	291,521	342,356	267,733	294,604	298,074	309,863	310,329
	R7	329,527	325,081	278,744	295,496	280,896	296,018	314,593	287,625	284,967
	R8	264,17	299,47	302,475	319,693	297,937	299,567	285,007	336,156	305,189
	R9	340,329	248,692	257,494	265,251	315,019	284,967	290,3	298,057	281,322
	R10	342,353	313,621	315,485	280,004	279,442	316,922	336,036	289,641	301,72
	R11	297,997	266,938	309,261	308,892	293,769	303,559	268,159	266,239	277,097
	R12	287,799	275,507	270,64	299,471	264,031	291,561	278,278	276,728	278,92
	R13	365,708	338,092	311,22	225,989	315,541	310,522	303,173	282,06	274,15
	R14	386,242	225,756	334,156	297,279	307,301	280,527	300,033	289,641	271,997
	R15	265,435	336,309	315,252	294,235	259,686	271,202	282,815	251,117	314,69
	R16	342,022	239,657	249,198	324,327	289,272	301,816	280,896	249,623	293,713
	R17	364,209	328,302	307,341	288,943	305,751	275,507	301,72	264,087	286,927
	R18	436,475	261,469	253,422	245,688	281,265	293,809	269,147	260,055	261,605
	R19	290,524	284,542	315,252	337,915	303,406	294,002	293,946	259,317	308,892
	R20	328,769	272,696	235,063	301,776	285,007	303,077	300,925	282,02	256,04

ANOVA de un factor

Perímetro

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16030,313	8	2003,789	2,240	,027
Intra-grupos	152993,531	171	894,699		
Total	169023,844	179			

Subconjuntos homogéneos

Perímetro

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	210,00	20	278,4433	
	60,00	20	283,9443	
	30,00	20	285,3306	285,3306
	120,00	20	287,5416	287,5416
	240,00	20	287,8432	287,8432
	90,00	20	288,3753	288,3753
	180,00	20	291,4331	291,4331
	150,00	20	295,3601	295,3601
	,00	20		313,7873
	Sig.			,690

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Circularidad	R1	0,857	0,891	0,851	0,799	0,781	0,895	0,855	0,886	0,857
	R2	0,822	0,809	0,801	0,779	0,781	0,866	0,803	0,839	0,806
	R3	0,82	0,888	0,784	0,861	0,881	0,709	0,809	0,859	0,765
	R4	0,869	0,886	0,826	0,882	0,817	0,833	0,828	0,822	0,823
	R5	0,836	0,843	0,836	0,808	0,822	0,795	0,745	0,784	0,86
	R6	0,843	0,779	0,824	0,731	0,866	0,816	0,823	0,678	0,773
	R7	0,885	0,904	0,823	0,87	0,831	0,826	0,836	0,664	0,848
	R8	0,798	0,868	0,744	0,783	0,831	0,716	0,864	0,573	0,865
	R9	0,872	0,857	0,835	0,872	0,799	0,836	0,786	0,69	0,83
	R10	0,841	0,826	0,842	0,714	0,884	0,764	0,81	0,787	0,861
	R11	0,875	0,857	0,845	0,714	0,847	0,84	0,789	0,823	0,866
	R12	0,862	0,812	0,8	0,843	0,876	0,808	0,855	0,817	0,902
	R13	0,771	0,855	0,818	0,871	0,837	0,821	0,845	0,841	0,809
	R14	0,854	0,888	0,841	0,828	0,758	0,854	0,88	0,741	0,885
	R15	0,897	0,824	0,79	0,768	0,848	0,886	0,891	0,825	0,764
	R16	0,833	0,857	0,825	0,882	0,746	0,784	0,84	0,849	0,852
	R17	0,862	0,669	0,809	0,779	0,866	0,883	0,863	0,809	0,854
	R18	0,827	0,828	0,829	0,831	0,815	0,864	0,806	0,841	0,881
	R19	0,886	0,765	0,813	0,767	0,845	0,891	0,834	0,858	0,765
	R20	0,876	0,827	0,885	0,656	0,845	0,783	0,83	0,811	0,842

ANOVA de un factor

Circularidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,053	8	,007	2,603	,010
Intra-grupos	,435	171	,003		
Total	,488	179			

Subconjuntos homogéneos

Circularidad

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	210,00	20	,7898	
	90,00	20	,8019	,8019
	60,00	20	,8211	,8211
	150,00	20	,8235	,8235
	120,00	20	,8288	,8288
	180,00	20	,8296	,8296
	240,00	20	,8354	,8354
	30,00	20	,8366	,8366
	,00	20		,8493
	Sig.			,088

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Diámetro Feret	R1	90,343	101,114	89,355	94,001	86,079	91,352	88,729	86,904	98,456
	R2	98,737	108,53	94,738	86,506	105,409	99,067	112,657	96,905	109,875
	R3	110,953	77,521	89,966	101,019	99,531	109,628	83,471	91,171	119,017
	R4	79,77	85,59	107,871	55,67	96,204	105,619	102,035	97,87	101,768
	R5	99,037	97,728	85,864	113,329	93,525	95,363	106,002	98,194	88,375
	R6	97,507	107,832	100,075	123,797	90,568	98,806	93,996	89,473	116,376
	R7	106,279	105,383	98,853	98,941	96,089	97,512	103,798	91,433	99,002
	R8	97,303	102,215	113,345	109,274	100,236	110,302	92,778	94,446	105,348
	R9	109,696	81,393	92,38	84,507	108,835	99,85	103,206	99,299	103,935
	R10	122,726	113,56	112,514	92,629	92,932	105,675	112,546	96,834	106,184
	R11	103,76	87,422	109,118	112,742	104,373	103,935	98,063	91,095	96,4
	R12	100,572	87,706	90,827	100,14	87,142	100,475	89,827	101,768	91,955
	R13	124,81	112,378	101,292	72,943	103,651	99,827	107,129	92,897	90,766
	R14	137,937	75,694	115,363	105,383	114,397	93,716	99,559	102,274	90,175
	R15	86,839	119,75	104,324	98,792	82,556	90,461	94,641	86,957	111,076
	R16	117,364	81,659	85,072	104,712	94,128	110,469	101,224	81,889	105,348
	R17	128,655	125,103	113,036	104,395	101,931	88,276	106,837	95,005	97,346
	R18	141,92	94,309	82,807	82,064	103,878	100,786	87,031	89,617	87,606
	R19	95,005	102,328	110,943	111,366	99,923	96,548	97,27	86,362	106,841
	R20	108,995	92,778	81,715	116,941	94,055	115,119	102,404	99,086	90,563

ANOVA de un factor

Feret

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2335,945	8	291,993	2,246	,026
Intra-grupos	22230,637	171	130,004		
Total	24566,582	179			

Subconjuntos homogéneos

Feret

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	210	20	93,4739	
	120	20	97,7721	97,7721
	30	20	97,9997	97,9997
	90	20	98,4576	98,4576
	60	20	98,9729	98,9729
	180	20	99,1602	99,1602
	150	20	100,6393	100,6393
	240	20	100,8206	100,8206
	0	20		107,9104
	Sig.		,520	,120

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
AR	R1	1,138	1,15	1,148	1,165	1,26	1,144	1,135	1,122	1,311
	R2	1,476	1,593	1,437	1,28	1,141	1,078	1,482	1,41	1,483
	R3	1,527	1,193	1,58	1,297	1,209	1,772	1,169	1,1	1,815
	R4	1,138	1,194	1,382	1,162	1,231	1,232	1,234	1,538	1,378
	R5	1,446	1,415	1,368	1,282	1,481	1,206	1,313	1,467	1,285
	R6	1,598	1,362	1,464	1,512	1,173	1,325	1,096	1,049	1,635
	R7	1,142	1,092	1,29	1,243	1,244	1,304	1,221	1,406	1,377
	R8	1,757	1,301	1,663	1,367	1,328	1,616	1,231	1,114	1,254
	R9	1,131	1,062	1,317	1,05	1,445	1,42	1,423	1,249	1,378
	R10	1,432	1,595	1,412	1,272	1,16	1,371	1,227	1,285	1,354
	R11	1,317	1,214	1,376	1,697	1,286	1,123	1,535	1,399	1,248
	R12	1,343	1,088	1,181	1,227	1,078	1,193	1,103	1,432	1,143
	R13	1,358	1,234	1,151	1,081	1,204	1,102	1,397	1,153	1,048
	R14	1,325	1,121	1,36	1,44	1,648	1,254	1,157	1,419	1,157
	R15	1,165	1,35	1,157	1,298	1,09	1,166	1,125	1,285	1,49
	R16	1,361	1,171	1,155	1,087	1,268	1,634	1,352	1,169	1,387
	R17	1,349	1,68	1,397	1,515	1,135	1,081	1,395	1,417	1,198
	R18	1,18	1,514	1,085	1,218	1,582	1,255	1,13	1,208	1,2
	R19	1,143	1,637	1,243	1,132	1,159	1,089	1,227	1,199	1,446
	R20	1,158	1,297	1,301	2,109	1,205	1,635	1,378	1,515	1,499

ANOVA de un factor

AR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,130	8	,016	,492	,861
Intra-grupos	5,652	171	,033		
Total	5,782	179			

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Redondez	R1	0,879	0,87	0,871	0,858	0,794	0,874	0,881	0,891	0,763
	R2	0,678	0,628	0,696	0,781	0,876	0,928	0,675	0,709	0,674
	R3	0,655	0,838	0,633	0,771	0,827	0,564	0,855	0,909	0,551
	R4	0,879	0,837	0,724	0,861	0,812	0,811	0,81	0,65	0,726
	R5	0,691	0,706	0,731	0,78	0,675	0,829	0,761	0,682	0,778
	R6	0,626	0,734	0,683	0,662	0,853	0,755	0,912	0,953	0,611
	R7	0,876	0,916	0,775	0,804	0,804	0,767	0,819	0,711	0,726
	R8	0,569	0,768	0,601	0,732	0,753	0,619	0,813	0,898	0,798
	R9	0,885	0,941	0,759	0,953	0,692	0,704	0,703	0,8	0,726
	R10	0,698	0,627	0,708	0,786	0,862	0,729	0,815	0,778	0,738
	R11	0,759	0,824	0,727	0,589	0,778	0,89	0,652	0,715	0,802
	R12	0,744	0,919	0,846	0,815	0,928	0,839	0,906	0,698	0,875
	R13	0,736	0,811	0,869	0,925	0,831	0,907	0,716	0,867	0,954
	R14	0,755	0,892	0,735	0,694	0,607	0,797	0,864	0,704	0,864
	R15	0,858	0,741	0,864	0,77	0,917	0,857	0,889	0,778	0,671
	R16	0,735	0,854	0,866	0,92	0,789	0,612	0,74	0,855	0,721
	R17	0,741	0,595	0,716	0,66	0,881	0,925	0,717	0,705	0,835
	R18	0,848	0,661	0,922	0,821	0,632	0,797	0,885	0,828	0,833
	R19	0,875	0,611	0,804	0,883	0,863	0,918	0,815	0,834	0,692
	R20	0,863	0,771	0,769	0,474	0,83	0,612	0,726	0,66	0,667

ANOVA de un factor

Redondez

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,040	8	,005	,513	,846
Intra-grupos	1,684	171	,010		
Total	1,725	179			

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Factor A/P	R1	18,474633	21,71493	18,03042	18,1751	15,82005	19,71997	18,09666	18,96038	19,75332
	R2	17,901955	19,47278	16,82472	16,03859	19,97205	21,42002	20,00629	17,99654	19,80995
	R3	20,012518	16,52229	15,33218	19,88626	20,7793	17,182	15,80202	19,51859	18,32825
	R4	16,990179	18,211	20,44986	11,94093	18,20683	20,04811	19,1804	17,60891	18,80379
	R5	18,137969	17,9872	16,3126	21,55355	16,50853	18,6559	18,38759	17,06953	17,96781
	R6	17,761045	19,91509	19,11077	19,91833	18,44202	19,13275	19,52181	16,71927	19,07735
	R7	23,219469	23,39342	18,24549	20,46198	18,56474	19,46138	20,93545	15,20368	19,23034
	R8	16,779774	20,67937	17,91323	19,91293	19,69772	17,06947	19,58957	15,31839	21,00112
	R9	23,60879	16,95789	17,10437	18,3993	20,04173	18,96208	18,1664	16,37416	18,57919
	R10	22,902615	20,62436	21,14484	15,91681	19,64681	19,2588	21,64965	18,1505	20,67786
	R11	20,755269	18,21402	20,78417	17,56197	19,78908	20,28863	16,83625	17,43506	19,09846
	R12	19,749276	17,81132	17,23321	20,07966	18,39712	18,73856	18,92805	17,98235	20,02699
	R13	22,427232	23,0081	20,25383	15,65794	21,02141	20,28452	20,39649	18,8669	17,65424
	R14	26,242682	15,9556	22,36955	19,58021	18,54003	19,07178	20,9998	17,07571	19,15858
	R15	18,951623	22,06477	19,82242	17,97666	17,51681	19,11966	20,05078	16,49344	19,14369
	R16	22,677839	16,34443	16,35804	22,77487	17,17072	18,8373	18,78114	16,86888	19,91515
	R17	24,971025	17,46627	19,77826	17,90109	21,07699	19,35577	20,71144	16,99472	19,50985
	R18	28,738358	17,22828	16,71776	16,24311	18,23258	20,20017	17,26037	17,39987	18,33888
	R19	20,490486	17,33316	20,39795	20,6271	20,396	20,85417	19,50144	17,70867	18,8083
	R20	22,931417	17,9544	16,56199	15,7451	19,15978	18,89567	19,88164	18,1903	17,15833

ANOVA de un factor

FactorAP					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	164,163	8	20,520	5,454	,000
Intra-grupos	643,402	171	3,763		
Total	807,566	179			

Subconjuntos homogéneos

FactorAP				
Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	20	17,39679		
210,000	20	18,31758	18,31758	
90,000	20	18,53728	18,53728	
60,000	20	18,94293	18,94293	
30,000	20	18,94901	18,94901	
120,000	20	19,10207	19,10207	
240,000	20	19,23416	19,23416	
180,000	20		19,32784	19,32784
150,000	20			21,18621
,000	20			
Sig.		,075	,777	,068

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

		Tiempo (min)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Solidez	R1	0,975	0,98	0,967	0,955	0,942	0,978	0,974	0,979	0,971
	R2	0,973	0,962	0,953	0,945	0,937	0,968	0,971	0,972	0,969
	R3	0,974	0,978	0,961	0,974	0,977	0,917	0,951	0,968	0,971
	R4	0,97	0,978	0,959	0,971	0,963	0,965	0,962	0,962	0,961
	R5	0,975	0,978	0,968	0,952	0,973	0,95	0,945	0,953	0,973
	R6	0,975	0,948	0,969	0,939	0,972	0,958	0,965	0,947	0,968
	R7	0,977	0,986	0,959	0,976	0,967	0,955	0,964	0,929	0,972
	R8	0,964	0,976	0,943	0,949	0,97	0,939	0,974	0,919	0,979
	R9	0,978	0,963	0,969	0,974	0,957	0,975	0,964	0,932	0,977
	R10	0,98	0,979	0,975	0,906	0,977	0,93	0,95	0,942	0,976
	R11	0,981	0,967	0,977	0,948	0,969	0,972	0,963	0,964	0,969
	R12	0,972	0,968	0,945	0,972	0,969	0,959	0,972	0,972	0,982
	R13	0,951	0,98	0,954	0,972	0,971	0,959	0,977	0,967	0,947
	R14	0,981	0,976	0,979	0,98	0,961	0,979	0,978	0,934	0,977
	R15	0,982	0,972	0,948	0,943	0,954	0,978	0,983	0,967	0,946
	R16	0,97	0,969	0,964	0,981	0,939	0,957	0,977	0,97	0,977
	R17	0,984	0,945	0,973	0,96	0,973	0,977	0,981	0,969	0,971
	R18	0,974	0,972	0,973	0,961	0,974	0,971	0,952	0,97	0,978
	R19	0,979	0,947	0,971	0,94	0,968	0,983	0,966	0,976	0,965
	R20	0,983	0,963	0,975	0,93	0,97	0,966	0,966	0,964	0,973

ANOVA de un factor

Solidez

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,006	8	,001	3,841	,000
Intra-grupos	,032	171	,000		
Total	,037	179			

Subconjuntos homogéneos

Solidez

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	90,000	20	,95640		
	210,000	20	,95780	,95780	
	150,000	20	,96180	,96180	,96180
	60,000	20	,96410	,96410	,96410
	120,000	20	,96415	,96415	,96415
	180,000	20	,96675	,96675	,96675
	30,000	20	,96935	,96935	,96935
	240,000	20		,97010	,97010
	,000	20			,97490
	Sig.			,071	,105

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

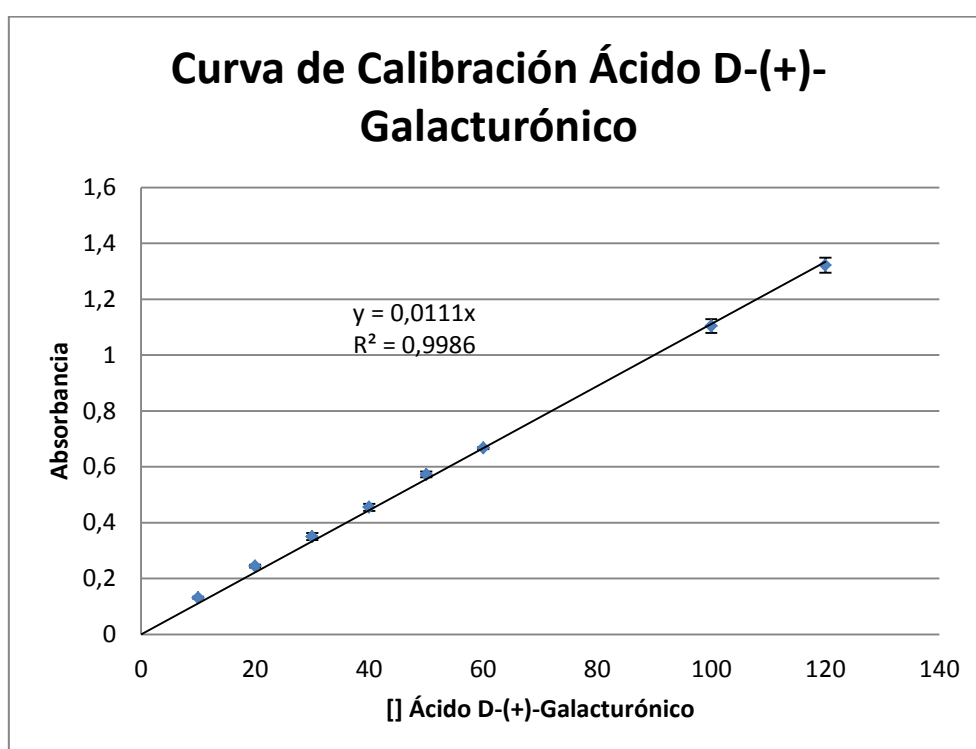
Anexo 6. Cálculo de la constante de afinidad Km y actividad enzimática.

Captura de datos

A partir de la muestra preparada de acuerdo a la metodología de extracción (5.3) y la metodología para la determinación de la actividad enzimática (5.4), se efectuó la lectura de la absorbancia (ABS) en el espectrofotómetro UV-Visible modelo Cary 100 a $\lambda=276$.

Determinación de la concentración de D-(+)-Ácido Galacturónico

Para hallar la concentración en nmol de ácido galacturónico se utiliza la ecuación de la curva de calibración de ácido D-(+)-Ácido Galacturónico monohidratado:



Los puntos indican el valor medio de tres datos y las barras la desviación.

La ecuación de la curva de calibración es:

$$\text{ABS} = 0.0111 [] \text{ Ácido D-(+)-Galacturónico} \quad (7)$$

La concentración de ácido D-(+)-Galacturónico en nmol se calcula transformando la ecuación (1) de la siguiente manera:

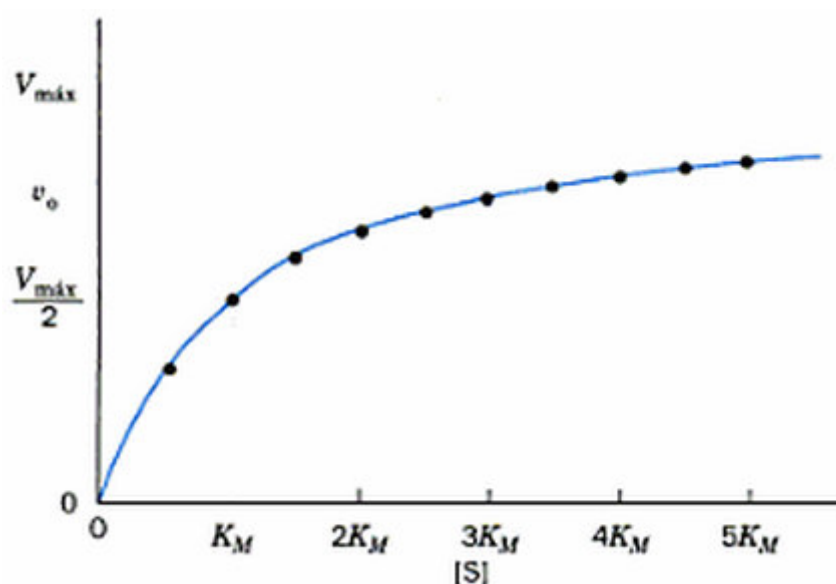
$$[] \text{ Ácido D-(+)-Galacturónico} = 0.0111/\text{ABS} \quad (8)$$

Cálculo de los parámetros de actividad enzimática (constante de afinidad K_m y Velocidad máxima $V_{m\acute{a}x}$)

El cálculo de los parámetros de actividad enzimática K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se desarrollaron de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Determinación de la curva de velocidad vs concentración:

Empleando 6 concentraciones de sustrato se busca encontrar la concentración para la cuál se da la velocidad máxima. El tiempo de incubación de la reacción fue de 10 minutos, así que para hallar la velocidad de reacción U (Upsilon) en nmol seg^{-1} se divide la concentración de ácido D-(+)-Galacturónico por 600 seg. La velocidad máxima está directamente relacionada con la concentración de saturación de la enzima a la concentración trabajada (0.00614mg de proteína) y bajo las condiciones de experimentación, temperatura 37°C y pH 4.4.



(Voet, Voet, & Pratt, 2007)

2. Linealización de la curva de velocidad vs concentración de acuerdo a la ecuación Lineweaver-Burk:

De acuerdo con el artículo *Statistical Estimations in Enzyme Kinetics* de G.N. Wilkinson en 1960 citado 3175 veces y el artículo *A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations* de J. E. Dowd y D. S. Riggs en 1965 citado 798 veces, se efectuó la linealización de los datos para determinar los valor de K_m y $V_{m\acute{a}x}$:

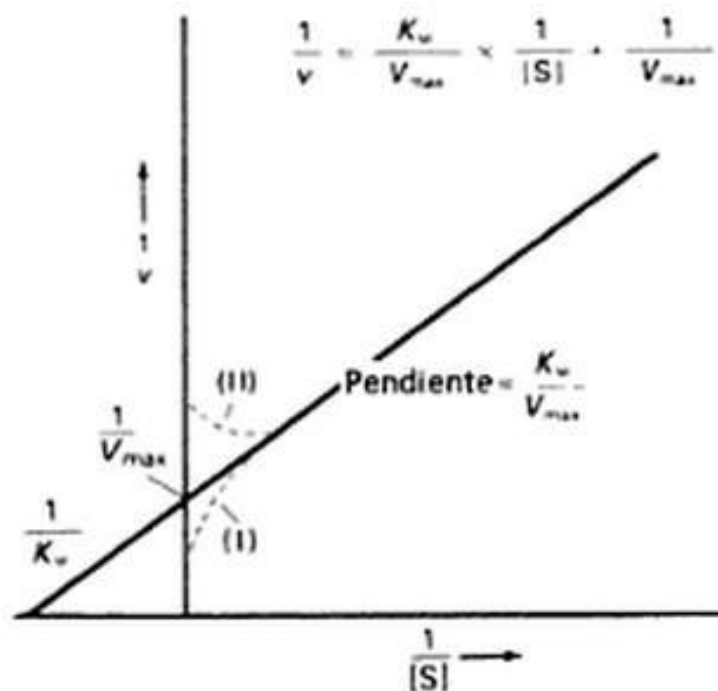
$$\frac{1}{U} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[Sustrato]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

En donde:

U (upsilon) representa la velocidad de reacción.

K_m es la constante numéricamente igual a la concentración de sustrato a la mitad de la velocidad máxima.

V_{max} es la velocidad máxima.



(Armstrong & Bennett, 1982)

Cálculo de la actividad enzimática

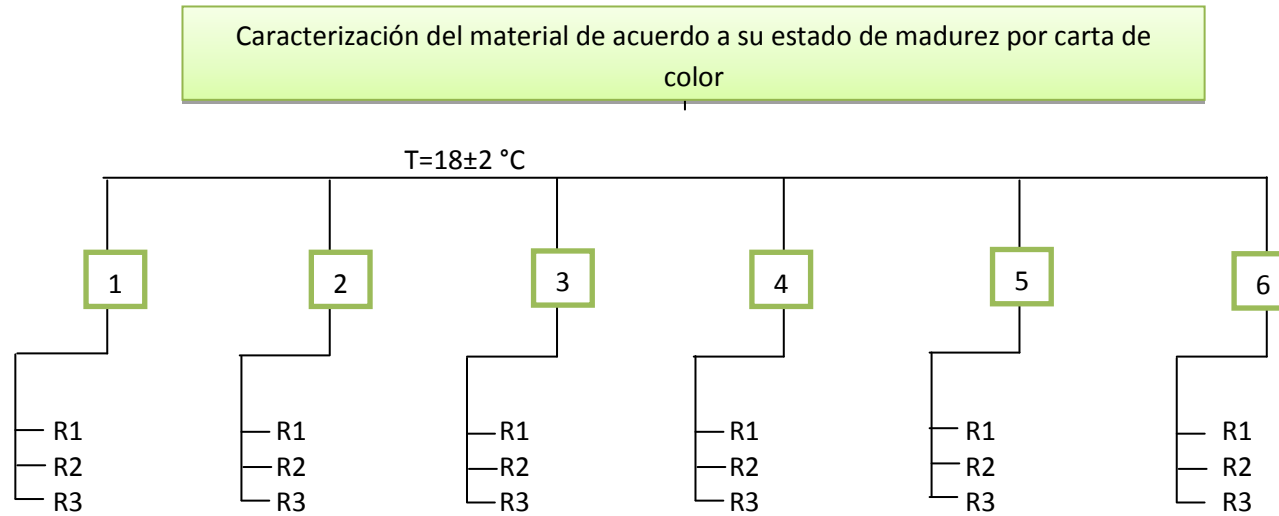
Cálculo de la velocidad de reacción

Una vez hallada la concentración de ácido D-(+)-Galacturónico a partir de la ecuación 8, se calcula la velocidad de reacción U (Upsilon) en nmol min^{-1} dividiendo la concentración de D-(+)-Galacturónico por 10 minutos, tiempo de incubación de la reacción.

Actividad enzimática

Para el cálculo de actividad enzimática, una unidad enzimática específica (U) se expresa como $\text{nmoles de ácido galacturónico producidas} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{minuto}^{-1}$. Por tanto, se divide la velocidad de reacción por los mg de proteína de cada extracto.

Anexo 7. Diseño Experimental



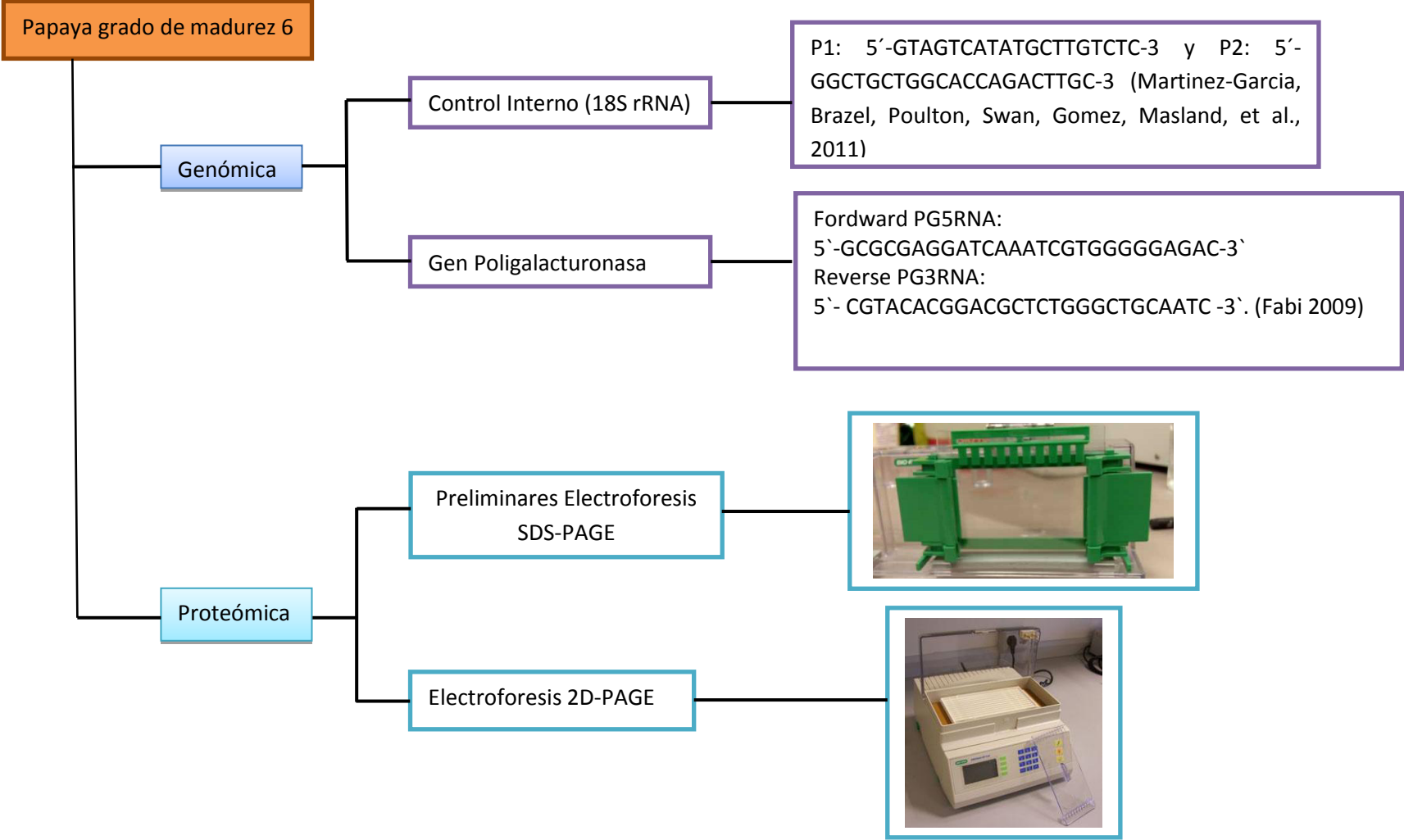
Número de Tratamientos: 6

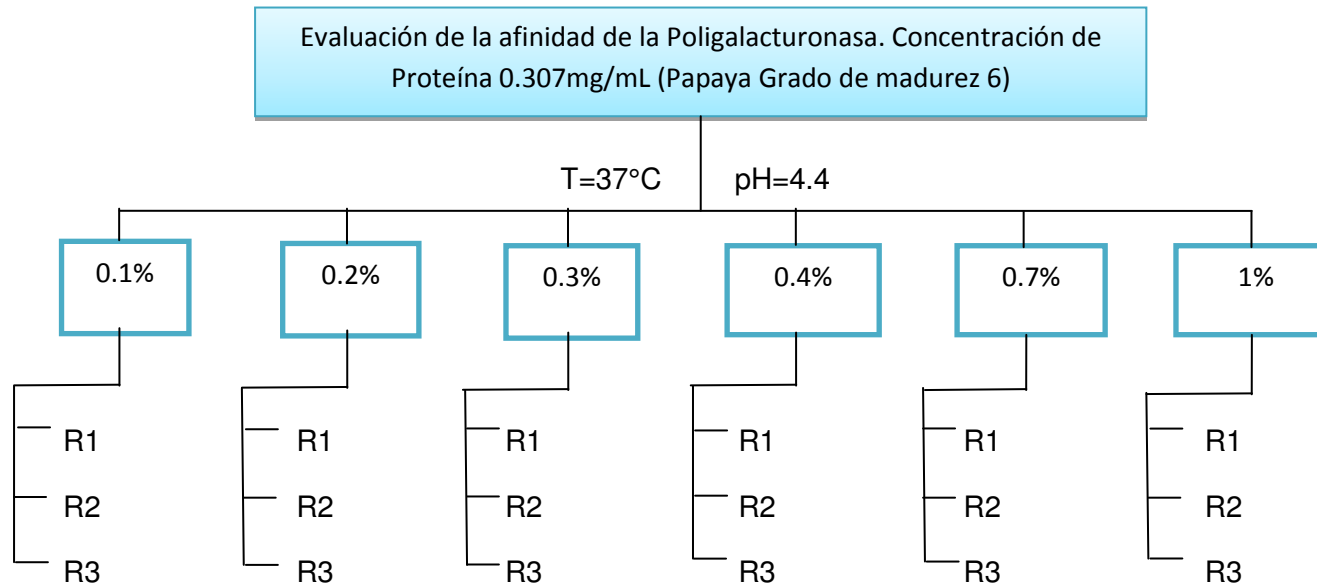
Cada número de tratamiento corresponde a cada estado de madurez relacionado a la carta de color.

Variables evaluadas: 3

- Tasa Respiratoria (Triplicado) 250g por unidad muestral.
- Sólidos Solubles Totales (Triplicado) 10g por unidad muestral.
- Firmeza (Triplicado) 8g por unidad muestral.

Diseño desestructurado secuencial



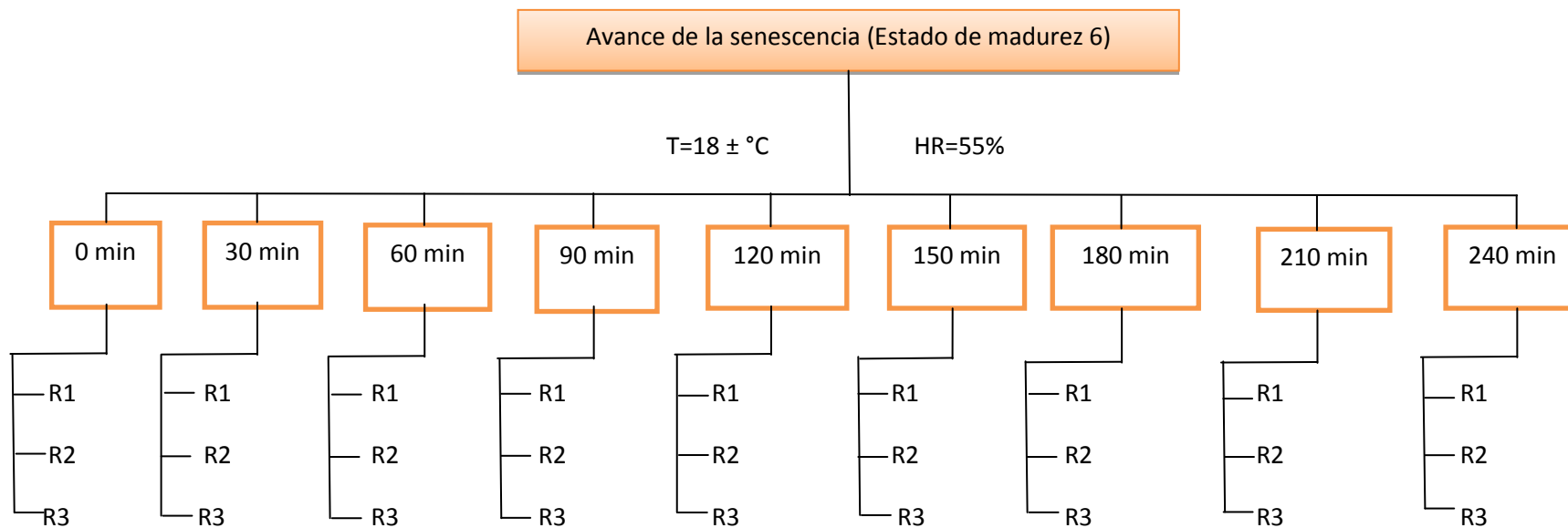


Número de Tratamientos: 6

Cada número de tratamiento corresponde a una concentración de sustrato, Ácido Poligalacturónico, en porcentaje (w/v). Los valores de las concentraciones se establecieron a partir de referencias bibliográficas (Bach & Schollmeyer, 1992; Gross, 1982; Lohani, Trivedi, & Nath, 2004).

Variables evaluadas:

- Establecimiento parámetros de actividad enzimática:
 - Afinidad de la Poligalacturonasa (K_m) (triplicado) 50g por unidad muestral.
 - Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) (triplicado) 50g por unidad muestral.



Número de Tratamientos: 9

Cada número de tratamiento corresponde a un tiempo en el avance de la senescencia.

Variables evaluadas:

- Actividad enzimática específica (Triplicado) 50g por unidad muestral.
- Análisis Proteómico semicuantitativo 1D-SDS Page para cada tiempo.
- Expresión de la Polygalacturonasa-RT-PCR (Triplicado) 2g por unidad muestral (Únicamente en los tiempos 0, 120 y 240min).
- Análisis de imágenes (20 réplicas) 2g por unidad muestral.
 - Perímetro
 - Área
 - Diámetro de Feret
 - Proporción Aspecto
 - Circularidad
 - Solidez
 - Redondez