

# EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN ATMÓSFERA CONTROLADA SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA Y NUTRICIONAL DEL TOMATE

José Ángel López Valenzuela; Francisco Javier Valverde Juárez;  
Silvia Lizzeth Mejía Torres; Gabriela López Angulo; Misael Odín Vega García<sup>¶</sup>

Universidad Autónoma de Sinaloa, calle Gral. Angel Flores Pte. s/n, Colonia Centro, C.P. 80000, Culiacán Rosales, Sinaloa. MÉXICO.  
Correo-e: mvega6@yahoo.com (\*Autor para correspondencia)

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del almacenamiento en Atmósferas Controladas (AC) sobre la calidad poscosecha y el contenido nutricional de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) 'Imperial'. Frutos de tomate en estado de madurez comercial fueron almacenados en refrigeración (aire ambiental, AIRE) o en AC (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) a 12 °C por 21 días antes de ser transferidos a un almacenamiento en aire a 23 °C por 12 días. Se retiraron tres frutas por cada tratamiento después de cero, cuatro, ocho y 12 días de maduración a 23 °C para evaluar el color externo, la firmeza, el contenido de sólidos solubles, las velocidades de producción de CO<sub>2</sub> y etileno y el contenido de ácido ascórbico, β-caroteno y licopeno. El almacenamiento en AC disminuyó la pérdida de firmeza y la degradación de ácido ascórbico. También disminuyó la producción de CO<sub>2</sub> y etileno y la síntesis de β-caroteno y licopeno; además, retrasó el desarrollo del color rojo y la maduración. Los resultados indican que el almacenamiento de tomate bajo condiciones de AC prolonga la vida de anaquel y el periodo de comercialización comparado con el sistema tradicional de refrigeración.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** *Solanum lycopersicum*, ácido ascórbico, β-caroteno, licopeno, actividad metabólica.

## EFFECT OF CONTROLLED ATMOSPHERE STORAGE ON THE POSTHARVEST AND NUTRITIONAL QUALITY OF TOMATO FRUIT

## ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the effect of Controlled Atmosphere (CA) storage on the postharvest quality and nutritional content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) 'Imperial'. Mature green fruit were stored at 12 °C under refrigeration (ambient air, AIR) or CA (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) at 12 °C for up to 21 days before being transferred to air at 23 °C for up to 12 days. Three fruits were taken per treatment after zero, four, eight and 12 days of ripening at 23 °C to evaluate external color, firmness, soluble solids content (SSC), CO<sub>2</sub> and ethylene production rates, and ascorbic acid, β-carotene and lycopene content. CA storage delayed the loss of firmness and ascorbic acid degradation. It also decreased CO<sub>2</sub> and ethylene production rate, β-carotene and lycopene synthesis, delaying red color development and ripening. The results indicate that storage of tomato fruit under CA extends the shelf life and the marketing period compared with traditional refrigeration systems.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** *Solanum lycopersicum*, ascorbic acid, β-carotene, lycopene, metabolic activity.

## INTRODUCCIÓN

El reciente interés de los consumidores y de las organizaciones de la salud por mantener una dieta saludable, ha incrementado la demanda de frutas y hortalizas frescas que se consumen a diario, debido a que representan una fuente importante de compuestos antioxidantes que son benéficos contra enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Nishiyama *et al.*, 2004). Esta situación ha generado nuevas oportunidades para que la industria hortícola mejore la calidad de las frutas y hortalizas a través de su valor nutricional.

El tomate es uno de los frutos económicamente más importantes a nivel mundial y México se ubica entre los primeros diez productores (SAGARPA, 2007). Este fruto es una buena fuente de vitaminas A y C (ácido ascórbico), así como carotenoides en la dieta humana, principalmente licopeno, debido a que es ampliamente consumido en diversas formas (Shi, 2000; Hanson *et al.*, 2004). Una porción promedio de tomate (148 g) es suficiente para proveer aproximadamente el 40 % de ácido ascórbico y el 20 % de vitamina A recomendados en la ingesta diaria (IDR) de los Estados Unidos (Simonne *et al.*, 2006). El ácido ascórbico es esencial para mantener las funciones cardiovasculares del cuerpo humano, para el desarrollo de las células, tejido conectivo y para la utilización de hierro (Nishiyama *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2006) y es un efectivo removedor de radicales libres (Hanson *et al.*, 2004). Los carotenoides son pigmentos naturales que presentan actividad provitamina A y que actúan como antioxidantes ejerciendo un efecto preventivo contra enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, el cáncer, cataratas y enfermedades cardiovasculares. El β-caroteno presenta la mayor actividad provitamina A y se ha demostrado que ejerce un efecto preventivo contra el cáncer debido a su habilidad para reaccionar con los radicales libres. El licopeno también ha sido asociado con beneficios a la salud debido a su capacidad para secuestrar moléculas de oxígeno singulete y radicales peroxilo, así como desactivar moléculas excitadas o agentes rompedores de cadena de ADN (Collins *et al.*, 2006).

El tomate es un fruto altamente perecedero y normalmente es almacenado y distribuido a temperatura de 10 - 12 °C para controlar la maduración, ya que es susceptible al daño por frío. El periodo de almacenamiento a estas temperaturas es corto y limita la posibilidad de comercio a países distantes que representan una oportunidad de mercado para los productores mexicanos. Una alternativa para este inconveniente es el uso de atmósferas controladas (AC), tecnología que implica el almacenamiento en concentraciones bajas de O<sub>2</sub> y/o elevadas de CO<sub>2</sub> para retrasar la velocidad de respiración, la producción de etileno y la pérdida de peso, y por lo tanto el deterioro del fruto (Crisosto *et al.*, 2002). Idealmente, la fruta almacenada en AC tendrá una menor

## INTRODUCTION

The recent interest of consumers and health organizations to maintain human health, has increased the demand of fresh fruits and vegetables in daily intake, since they represent the main source of antioxidant compounds with beneficial effects against chronic diseases such as cancer and cardiovascular diseases (Nishiyama *et al.*, 2004). This has created new opportunities for the horticulture industry to improve the quality of fruit and vegetables by enhancing their nutritional value.

Tomato is one of the most economically important vegetables worldwide and Mexico is among the top ten producers (SAGARPA, 2007). This fruit is a good source of vitamins A and C (ascorbic acid), as well as carotenoids, mainly lycopene, in human diets because of its high consumption in many ways (Shi, 2000; Hanson *et al.*, 2004). An average-size tomato fruit (148 g) is sufficient to provide about 40 % of the U.S Recommended Daily Allowance (RDA) of ascorbic acid and 20 % of vitamin A (Simonne *et al.*, 2006). Ascorbic acid is essential to maintain the human cardiovascular functions, cell development and iron use (Nishiyama *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2006) and it is also an effective scavenger of free radicals (Hanson *et al.*, 2004). Carotenoids are natural pigments with provitamin A capacity that also act as antioxidants and preventive agents against degenerative diseases related to age, cancer, cataracts and cardiovascular diseases. β-carotene has the greater provitamin A activity and has been demonstrated to provide a preventive effect against cancer due to its ability to interact with free radicals. Lycopene has also been associated with benefits to human health by scavenging singlet oxygen and peroxy radicals and deactivating excited molecules or DNA chain-breaking agents (Collins *et al.*, 2006).

Tomato is a highly perishable fruit and it is usually stored and distributed at 10 – 12 °C to control ripening, since it is susceptible to chilling injury. The storage period at these temperatures is quite short and limits its commerce to distant countries that represent a market opportunity for Mexican producers. An alternative solution for this problem is the use of controlled atmosphere (CA), a technology that requires storage under reduced O<sub>2</sub> and/or elevated CO<sub>2</sub> concentrations to delay respiration rate, ethylene production and weight loss, and therefore fruit deterioration (Crisosto *et al.*, 2002). Ideally, fruit stored under CA should have lower respiration rate, reduced ethylene sensitivity and transpiration, resulting in a delay of the ripening process to maintain fruit quality. Nevertheless, the response of vegetable tissues to CA storage varies significantly depending of several factors such as the cultivar, making necessary to conduct investigations that evaluate the potential use of this storage alternative to extend the shelf life and the marketing period while maintaining the quality of tomato fruit. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the CA storage on the postharvest and nutritional quality of tomato fruit.

velocidad de respiración, una reducida sensibilidad al etileno y a la transpiración, resultando en un retraso del proceso de maduración que mantendrá la calidad de la fruta. Sin embargo, la respuesta de los tejidos vegetales al almacenamiento en AC varía significativamente dependiendo de varios factores como el cultivar, lo que obliga a investigar el uso potencial de esta alternativa de almacenamiento para extender la vida de anaquel y el periodo de comercialización manteniendo la calidad del fruto de tomate. Atendiendo a esta inquietud, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del almacenamiento en AC sobre la calidad poscosecha y el contenido nutricional de tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima y condiciones de almacenamiento

Frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) 'Imperial' fueron cultivados durante la temporada de 2007 en una huerta local en Culiacán, Sinaloa; el área de producción de tomate más importante de México. Frutos en estado verde-maduro fueron cosechados y seleccionados con base en su uniformidad de color y ausencia de daños físicos y microbiológicos. Los tomates fueron lavados y divididos al azar en dos grupos; un grupo fue almacenado en condiciones de aire ambiental (AIRE) a 12 °C y 90 ± 2 % de humedad relativa; mientras que el otro fue almacenado en AC (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) a 12 °C, ambos por 21 días. Para crear la AC, 45 frutas fueron colocadas en contenedores de vidrio de 20 litros y se dejaron equilibrar a 12 °C para luego ser conectados a un flujo continuo (75 ml·min<sup>-1</sup>) de la mezcla de gases deseada y previamente humidificada. El CO<sub>2</sub> producido por la fruta dentro de los contenedores fue removido completamente usando sacos de tela contenido 1 kg de cal comercial. Se realizaron evaluaciones diarias de las concentraciones de gases con un analizador de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> modelo GCS-150 (Gas control systems, Inc, Model GCS-150, MI, EU). Los frutos fueron retirados de los almacenamientos (AIRE y AC) cada tres días. En cada día de retiro, 12 frutos por tratamiento fueron transferidos a condiciones de aire ambiental a 23 °C por 12 días para simular condiciones de comercialización y para evaluar la calidad y el contenido nutricional (cada cuatro días). Un total de 18 frutos más por cada tratamiento fueron retirados después de 21 días de almacenamiento para medir la producción de gases (diariamente). Para los análisis nutricionales, el pericarpio de los frutos almacenados en ambas condiciones fue congelado con CO<sub>2</sub> y mantenido a -80 °C hasta ser utilizado para la extracción y evaluación. Se emplearon un total de 222 frutos para ambos tratamientos.

### Evaluación de la calidad

El color externo (*L*, *a*, *b*) fue medido en cada fruto (tres frutos por tratamiento) utilizando un colorímetro de reflectancia (Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japón)

## MATERIALS AND METHODS

### Fruit material and storage conditions

Tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) 'Imperial' was grown during the 2007 season at a local farm in Culiacán, Sinaloa, the most important tomato-growing area in Mexico. Mature green fruit was hand-harvested and sorted based on size uniformity, color, freedom of physical and microbial injury and immediately transported to the laboratory. Tomatoes were washed and randomly divided into two groups; one group was stored under ambient air conditions (AIR) at 12 °C and 90 ± 2 % relative humidity, while the other group was stored under CA (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) at 12 °C and the same relative humidity, both for 21 days. To create the CA storage, about 45 fruits were placed into 20 liter glass jars and allowed them to equilibrate at 12 °C, then the jars were connected to a continuous flow (75 ml·min<sup>-1</sup>) of the desired mixture previously humidified in a water column. The CO<sub>2</sub> produced by the fruit inside the jar was removed completely using bags containing 1 kg of lime. The gases were checked daily using a digital O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> analyzer (Gas control systems, Inc, Model GCS-150, MI, USA). Fruits were sampled initially and at three-day intervals from either AIR or CA storage. At each sampling day, 12 fruits per treatment were transferred to ambient air at 23 °C for 12 days to simulate marketing conditions and to evaluate quality and nutritional content (at four-day intervals). A total of 18 more fruits per treatment were sampled at 21 days to measure gases production (daily). For nutritional analysis, the pericarp of fruits stored in both conditions was frozen with CO<sub>2</sub> and kept at -80 °C until used for extraction and evaluations of nutritional content. A total of 222 fruits were used for both treatments.

### Fruit quality evaluation

Skin color (*L*, *a*, *b*) was measured from each fruit (three fruits per treatment) using a reflectance colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan) with pulsed xenon arc lamp, 2° observation (CIE), illuminant C and 8 mm diameter measuring area. Three measurements were taken at three different points of the equatorial region of each fruit and the average value was calculated. Results were expressed as total color difference ( $\Delta E^*$ ) with respect to initial values at harvest using the following expression:

$$\Delta E^* = [(L^{**}-L^*)^2 + (a^{**}-a^*)^2 + (b^{**}-b^*)^2]^{0.5}$$

where: *L*<sup>\*</sup>, *a*<sup>\*</sup> y *b*<sup>\*</sup> were the initial values at harvest and *L*<sup>\*\*</sup>, *a*<sup>\*\*</sup> y *b*<sup>\*\*</sup> were values at day of evaluation.

Fruit pericarp firmness was determined at three equidistant locations in the equatorial region with a digital penetrometer (Chatillon DFE 100, AMETEK Inc, Largo, FL), fitted with a 11 mm diameter probe. The pericarp was penetrated to a depth of 5 mm using a constant speed of 50 mm·min<sup>-1</sup>. Data were expressed in Newtons (N) as the

equipado con una lámpara de xenón, 2º observación (CIE), iluminante C y 8 mm de diámetro en el área de medición. Se realizaron tres mediciones en tres puntos diferentes de la región ecuatorial y se calculó el valor promedio. Los resultados fueron expresados como la diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ) con respecto a los valores de la cosecha utilizando la siguiente expresión:

$$\Delta E^* = [(L^{**}-L^*)^2 + (a^{**}-a^*)^2 + (b^{**}-b^*)^2]^{0.5}$$

donde:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  fueron los valores iniciales de cosecha y

$L^{**}$ ,  $a^{**}$  y  $b^{**}$  fueron los valores al día de evaluación.

La firmeza en el pericarpio de tomate fue determinada en tres puntos equidistantes de la región ecuatorial utilizando un penetrómetro digital (Chatillon DFE 100, AMETEK Inc, Largo, FL), equipado con una punta de 11 mm de diámetro. El pericarpio fue penetrado a una profundidad de 5 mm utilizando una velocidad constante de 50 mm·min<sup>-1</sup>. Los datos fueron expresados en Newtons (N) como la fuerza máxima requerida para penetrar la pulpa.

El contenido de sólidos solubles totales (SST) fue determinado del jugo utilizando un refractómetro de temperatura compensada (ABBE, Bellingham+Stanley Ltd., Londres, Inglaterra). Los resultados fueron expresados en ° Brix. Las evaluaciones fueron hechas por duplicado usando tres frutos por tratamiento.

Los cambios en las velocidades de respiración y de producción de etileno fueron determinados en tres frutos previamente pesados y colocados en contenedores de vidrio de 5 litros; se utilizaron seis repeticiones por tratamiento. Los contenedores fueron almacenados a 23 °C y conectados a un flujo continuo (20 ml·min<sup>-1</sup>) de aire húmedo durante 8 días. Las producciones de CO<sub>2</sub> y etileno fueron monitoreadas diariamente utilizando un analizador digital O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Gas control systems, Inc, Model GCS-150, MI, EU) y un analizador C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Gas control systems, Inc, Model ICA 56, MI, EU). La producción de etileno fue expresada como  $\mu\text{l C}_2\text{H}_4\text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la producción de CO<sub>2</sub> se correlacionó con el peso de los frutos y el flujo del aire como sigue:

$$\text{ml CO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1} = ([\text{CO}_2] \text{ entrada} - [\text{CO}_2] \text{ salida}) (F \times 60 \text{ min}) / 100 \times P$$

donde,  $F$  = flujo del aire (20 ml·min<sup>-1</sup>);  $P$  = peso de la muestra (kg).

Los resultados fueron reportados como mg CO<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> a 23 °C utilizando un factor de corrección de 1.84.

### Determinación de ácido ascórbico y carotenoides

El contenido de ácido ascórbico se determinó de acuerdo con Gökmen *et al.* (2000). Todas las extracciones se llevaron a cabo en ausencia de luz. Para ácido ascórbico, 20 g de fruta congelada fueron homogenizados con 100 ml de agua desionizada fría utilizando una licuadora comercial (Osterizer, Jarden Corporation, NY, EU) y se filtró a través de

maximum force required to penetrate the flesh.

The soluble solids content (SSC) was determined from the tomato juice using a temperature-compensated refractometer (ABBE, Bellingham+Stanley Ltd., London, England). Results were expressed in °Brix. Evaluations were made by duplicate using three fruits per treatment.

Changes in respiration and ethylene rates were determined from three fruits weighed and placed in a 5 liter glass jar; six replicates per treatment were used. The jars were placed at 23 °C and connected to a continuous flow (20 ml·min<sup>-1</sup>) of humidified air for eight days. CO<sub>2</sub> and ethylene production were monitored daily using a digital O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> analyzer (Gas control systems, Inc, Model GCS-150, MI, USA) and a digital C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> analyzer (Gas control systems, Inc, Model ICA 56, MI, USA). Ethylene production rate was expressed as  $\mu\text{l C}_2\text{H}_4\text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$  and CO<sub>2</sub> production was correlated with the fruit weight and air flow as follow:

$$\text{ml CO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1} = ([\text{CO}_2] \text{ inlet} - [\text{CO}_2] \text{ outlet}) (F \times 60 \text{ min}) / 100 \times W$$

where,  $F$  = air flow (20 ml·min<sup>-1</sup>);  $W$  = sample weight (kg).

Results were reported as mg CO<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> at 23 °C using a correction factor of 1.84.

### Determination of ascorbic acid and carotenoid content

Ascorbic acid content was determined according to Gökmen *et al.* (2000). All extractions were carried out in absence of light. For ascorbic acid, 20 g of frozen fruit were homogenized with 100 ml of degassed and cold deionized water using a commercial blender (Osterizer, Jarden Corporation, NY, USA) and filtered using organza cloth. A second filtration was done using 0.45 µm disposable filters (Pall Corporation, NY, USA) followed by Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Waters Corporation, Milford, MA). A 1 ml aliquot was analyzed using a liquid chromatograph (HPLC Agilent 1100, Waldbronn, Germany) equipped with a Sphereclone ODS2 column (250 mm x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex, USA) operated at 16 °C. The mobile phase used was monobasic potassium phosphate 25 mM and the flow rate was 0.7 ml·min<sup>-1</sup>. Organic solvents for the HPLC mobile phase were HPLC-grade. The absorbance was determined at 254 nm during 15 min with an injection of 10 µl. Results were correlated with a curve obtained using commercial standard (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) and were expressed as mg·100 g<sup>-1</sup> of fresh weight (FW).

The procedure of Hanson *et al.* (2004) was used to determine β-carotene and lycopene content. 20 g of frozen fruit were homogenized with 40 ml of extraction solution (hexane:acetone at 60:40) and 0.1 g MgCO<sub>3</sub> during 20 seconds. Acetone was then washed out five times with NaCl-saturated water and the hexane extract was filtered with a 0.45 µm disposable filter (Pall Corporation, NY, USA). A 1 ml aliquot was analyzed by HPLC using a YMC carotenoid column (250 mm x 4.6 mm x 5 µm, YMC Co Ltd, Japan) operated at 30 °C. The mobile phase consisted of

tela de organza. Una segunda filtración se realizó con filtros de jeringa de 0.45 µm (Pall Corporation, NY, EU) seguido por cartuchos Sep-pak Classic C<sub>18</sub> (Waters Corporation, Milford, MA). Una alícuota de 1 ml fue analizada en un cromatógrafo (HPLC Agilent 1100, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna Sphereclone ODS2 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex, EU) operada a 16 °C. Se utilizó como fase móvil fosfato monobásico de potasio 25 mM con un flujo de 0.7 ml·min<sup>-1</sup>. Los solventes orgánicos para la fase móvil fueron grado HPLC. La absorbancia fue determinada a 254 nm durante 15 min con una inyección de 10 µl. Los resultados fueron correlacionados con una curva obtenida usando un estándar comercial (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) y fueron expresados como mg·100 g<sup>-1</sup> de peso fresco (PF).

El procedimiento de Hanson *et al.* (2004) fue usado para determinar el contenido de β-caroteno y licopeno. 20 g de fruta congelada fueron homogenizados con 40 ml de una solución de extracción (hexano:acetona, 60:40) y 0.1 g de MgCO<sub>3</sub> por 20 segundos. La acetona fue lavada cinco veces con agua saturada de NaCl y el extracto de hexano fue filtrado con filtros de 0.45 µm. Una alícuota de 1 ml fue analizada por HPLC usando una columna YMC carotenoid (250 mm x 4.6 mm x 5 µm, YMC Co Ltd, Japón) a 30 °C. La fase móvil consistía de una mezcla de terbutilmetileter (15 %), metanol (81 %) y agua (4 %) hasta lograr un gradiente de 77.5 % terbutilmetileter, 18.5 % metanol y 4 % agua. La velocidad de flujo fue de 0.7 ml·min<sup>-1</sup> y la longitud de onda fue de 447 nm para β-caroteno y 478 nm para licopeno durante 80 min con una inyección de 100 µl. La integración de los cromatogramas se realizó con el sistema Agilent ChemStation (Santa Clara, CA, EU). Los resultados de β-caroteno y licopeno fueron correlacionados con una curva obtenida usando estándares comerciales (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO).

### Análisis estadístico

Se utilizaron dos diseños experimentales completamente aleatorios. Para las variables respuesta ΔE\*, firmeza, SST, contenido de ácido ascórbico, β-caroteno y licopeno, los factores fueron las condiciones de almacenamiento (AIRE y AC) y los días de maduración a 23 °C (cero, cuatro, ocho, 12). Para la producción de etileno y la velocidad de respiración, los factores fueron el tipo de almacenamiento (AIRE y AC) y los días de maduración a 23 °C (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7). Los resultados fueron analizados usando un ANOVA y las medias se compararon por LSD ( $P < 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS 6.0 (Manugistics, Rockville, MD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Color externo

El color externo es un índice de calidad importante para los consumidores. La Figura 1 muestra la diferencia total de color de tomate almacenado durante tres y 21 días

a una mezcla de methyl *tert*-butyl ether (15 %), methanol (81 %) y agua (4 %) que varió con un gradient (75 min) para llegar a 77.5 % methyl *tert*-butyl ether, 18.5 % methanol y 4 % agua. La tasa de flujo se estableció en 0.7 ml·min<sup>-1</sup> y la longitud de onda del detector se estableció en 447 nm para β-caroteno y 478 nm para licopeno para 80 min con una inyección de 100 µl. La integración de los cromatogramas se realizó con el sistema Agilent ChemStation data system for windows software (Santa Clara, CA, USA). Los solventes orgánicos para la fase móvil fueron grado HPLC. Los resultados de β-caroteno y licopeno fueron correlacionados con una curva obtenida usando un estándar comercial (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO).

### Statistical analyses

Two completely randomized factorial experimental designs were used. For the response variables ΔE\*, firmness, SSC, ascorbic acid, β-carotene and lycopene content, the factors were storage conditions (AIR and CA) and days of ripening (zero, four, eight, 12 days) at 23 °C. For ethylene production and respiration rates, the factors were storage conditions (AIR and CA) and days of ripening (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7) at 23 °C. Statistical analyses of data were performed through analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics plus 6.0 (Manugistics, Rockville, MD) and the means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Skin color

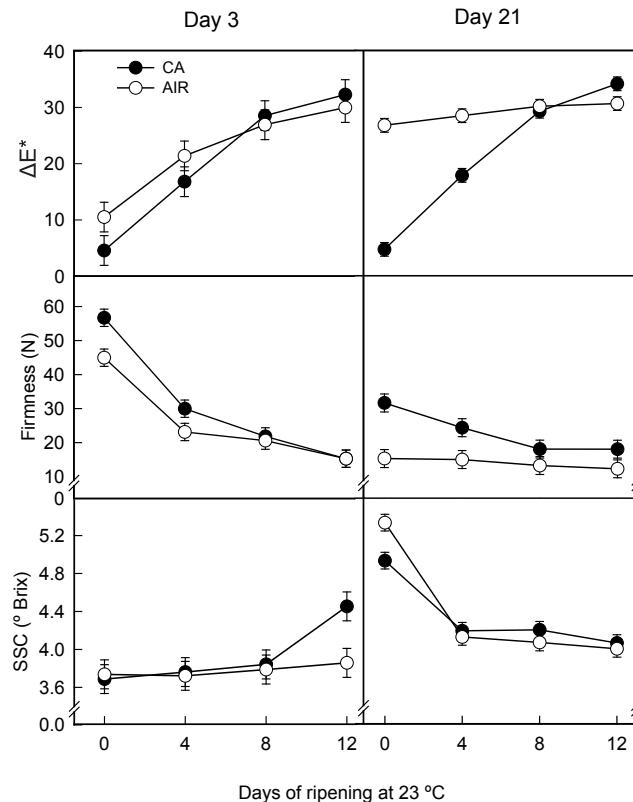
External tomato color is an important quality index for consumers. Figure 1 shows the total color differences of tomato stored during three and 21 days under AIR and CA at 12 °C, and then transferred to 23 °C. ΔE\* values near to zero indicate that fruits did not show great color changes when compared to those at harvest, while ΔE\* values up to 10 were indicative of differences in coloration. After three days of storage at 12 °C under AIR or CA conditions, a general increase in ΔE\* values from 4.9 to about 34 was observed during the ripening period. However, significant differences in color between AIR and CA treated fruits were only observed at the time they were removed from the low temperature storage, suggesting that storing the fruit three days at 12 °C was too short to exert a positive effect on color retention. Moura *et al.* (1999) also reported that seven days of storage at 12 °C in an atmosphere containing 4 kPa O<sub>2</sub> was insufficient to delay ripening of tomato. On the other hand, fruit stored under CA for 21 days at 12 °C showed significantly lower ΔE\* values during the first four days of the ripening period at 23 °C compared with AIR-treated fruit. These results indicate that for a given time of storage at 12 °C, the main effect on fruit color changes can be attributed to the type of storage (CA or AIR). Both storage conditions resulted in similar values at day eight but after 12 days of ripening CA-treated fruit had higher ΔE\* values than AIR-treated fruit. This indicates that CA was effective delaying

en condiciones de AIRE y AC a 12 °C, y luego transferidos a 23 °C. Valores de  $\Delta E^*$  cercanos a cero indican que las frutas no mostraron grandes cambios de color con respecto a los valores iniciales, mientras que valores por arriba de 10 fueron indicativos de diferencias en coloración. Después de tres días de almacenamiento a 12 °C en AIRE o en AC, se observó un aumento general de los valores de  $\Delta E^*$  que variaban desde 4.9 hasta 34 durante la maduración. Sin embargo, sólo se presentaron diferencias significativas entre los almacenamientos el día que la fruta fue removida de la baja temperatura, lo que sugiere que un periodo de tres días a 12 °C es muy corto para ejercer un efecto positivo sobre la retención de color. Moura *et al.* (1999) también reportaron que un almacenamiento durante siete días a 12 °C en una atmósfera con 4 kPa de O<sub>2</sub> resultaba insuficiente para retrasar la maduración de tomate. Por otra parte, la fruta almacenada en AC a 12 °C por 21 días presentó valores de  $\Delta E^*$  más bajos durante los primeros cuatro días del periodo de maduración a 23 °C comparados con los de la fruta de AIRE. Estos resultados indican que el efecto principal sobre el cambio en el color puede atribuirse al tipo de almacenamiento. Ambos tratamientos tuvieron valores similares en el día ocho, pero después de 12 días de maduración la fruta de AC tuvo valores mayores de  $\Delta E^*$  que la fruta de AIRE. Esto indica que la AC fue efectiva retrasando los cambios de color durante los primeros días, pero el efecto se perdió a medida que la maduración avanzaba, por lo tanto la habilidad del fruto para desarrollar el color rojo no se vio afectada por la atmósfera de bajo oxígeno. En otro estudio, Kim *et al.* (1999) observaron que el desarrollo del color rojo de tomate almacenado en AC (3 kPa O<sub>2</sub>) a 20 °C iniciaba después de nueve días, mientras que la fruta mantenida en aire a la misma temperatura mostraba un color rojo avanzado. Resultados similares también han sido reportados por Gómez y Camelo (2002) y por Batu (2003) en tomate almacenado en diferentes concentraciones de O<sub>2</sub>.

Los cambios en color son controlados por enzimas que dependen del oxígeno y que regulan la síntesis de β-caroteno y licopeno y la degradación de clorofila (Bramley, 1997). En este estudio, el flujo continuo de aire a través de los contenedores evitó la acumulación de etileno, sugiriendo que el retraso en el desarrollo del color fue debido al bajo oxígeno. Una concentración mínima de O<sub>2</sub> es requerida para la acción del etileno y el bajo oxígeno utilizado durante el almacenamiento en AC (4 kPa) podría ser la causa del retraso en la aparición del color rojo. Por otra parte, el desarrollo del color rojo del tomate está relacionado con la degradación de clorofila y la síntesis de carotenoides, especialmente licopeno, y esta síntesis también es dependiente de oxígeno.

### Firmeza

La firmeza en la cosecha fue de aproximadamente 67.6 N. En general, se observó una pérdida continua de firmeza en ambos tratamientos durante el periodo de maduración



**FIGURA 1.** Cambios en color, firmeza y sólidos solubles totales (SST) durante la maduración a 23 °C de tomate 'Imperial' después de su almacenamiento durante 3 y 21 días en condiciones de aire ambiental y AC. Cada punto representa la media de tres réplicas. Las barras verticales indican LSD ( $P \leq 0.05$ ).

**FIGURE 1.** Changes in total color difference, firmness and soluble solids content (SSC) during ripening of tomato fruits 'Imperial' after storage for 3 and 21 days under AIR or CA conditions and then transferred to 23 °C. Each point represents the mean of three replicates. Vertical bars indicate LSD ( $P \leq 0.05$ ).

the color changes during the first days of ripening, but this effect was lost as the ripening advanced, therefore the ability of the fruit to develop the red color was not affected by the low oxygen atmosphere. Kim *et al.* (1999) also studied the storage of tomato in CA (3 kPa O<sub>2</sub>) and ambient air at 20 °C and observed that red color development of fruit under CA conditions started after 9 days, while fruit stored under ambient conditions showed an advanced red color by day nine. Similar results have been reported in tomato stored under different O<sub>2</sub> concentrations by Gómez and Camelo (2002) and Batu (2003).

Fruit color changes are controlled by ethylene dependent enzymes that regulate lycopene and β-carotene synthesis and chlorophyll degradation (Bramley, 1997). The continuous sweeping of the atmosphere used in this study should have prevented the external accumulation of ethylene, suggesting that the delay in color development was due to the low oxygen. A minimal O<sub>2</sub> concentration is required for ethylene action and the low O<sub>2</sub> level (4 kPa) used during the CA storage could be the cause of red color

a 23 °C (Figura 1). Una vez transcurridos tres días de almacenamiento a 12 °C, las frutas almacenadas en AC y en AIRE mostraron diferencias significativas en la firmeza durante los primeros cuatro días a 23 °C, mientras que no se observaron tales diferencias en los días de maduración posteriores. Un comportamiento similar pero con mayores diferencias se observó después de 21 días a 12 °C, indicando que el efecto principal sobre la firmeza se debía al tipo de almacenamiento. Las diferencias determinadas entre ambas condiciones de almacenamiento fueron estadísticamente significativas. Las frutas almacenadas en AIRE perdieron su firmeza durante el almacenamiento a 12 °C y mostraron valores similares durante la maduración. La fruta de AC tuvo una mejor retención de firmeza que la fruta de AIRE durante los primeros días de maduración a 23 °C. Este comportamiento puede asociarse a una reducida actividad de las enzimas degradadoras de pared celular, tales como poligalacturonasa y pectinmetilesterasa promovido por la baja concentración de oxígeno (Kader, 2003). Adicionalmente, el efecto positivo de la AC sobre la retención de firmeza se soporta en estudios previos que demuestran que concentraciones bajas de O<sub>2</sub> han sido exitosas para retener la firmeza de tomate (Sozzi *et al.*, 1999; Gómez and Camelio, 2002), fresa (Nunes *et al.* 2002) y manzana (Saftner *et al.*, 2002; De Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los reportados por Bender *et al.* (2000), quienes observaron que atmósferas de bajo oxígeno no eran efectivas para reducir el ablandamiento de mangos 'Haden' y 'Tommy Atkins' almacenados a 12 y 15 °C al compararlos con frutos almacenados en aire.

### Sólidos Solubles Totales (SST)

Los SST de la fruta almacenada por tres días a 12 °C en AC o en AIRE no mostraron cambios significativos durante los primeros ocho días a 23 °C con valores cercanos a 3.7 ° Brix (Figura 1), sugiriendo que la AC no ejerció ningún efecto. Después de 12 días de maduración, la fruta de AC obtuvo valores mayores que la fruta de AIRE (4.4 y 3.8 ° Brix, respectivamente), lo cual puede asociarse a una mayor hidrólisis de almidón motivada por una maduración más avanzada. Cuando la fruta almacenada en AIRE por 21 días a 12 °C fue transferida a 23 °C, obtuvo valores mayores de SST que la almacenada en AC; sin embargo, la fruta de ambos tratamientos resultó con valores similares durante el resto de la maduración. Este comportamiento indica que durante las etapas tempranas de maduración el almidón fue hidrolizado y el contenido de SST aumentó, pero una vez que la fruta alcanzó una madurez más avanzada, los SST disminuyeron debido al incremento en la velocidad de respiración. Los resultados de SST de ambos tratamientos fueron consistentes con los reportados por Gómez y Camelio (2002) y por Batu (2003). Además, McGlasson (2003) reportó que un valor entre 4 y 6 ° Brix es adecuado para un buen sabor en tomate.

delay. On the other hand, red color development in tomato fruit is related to chlorophyll degradation and carotenoid synthesis, especially lycopene, and the synthesis of these components is also O<sub>2</sub> dependent.

### Firmeza

The firmness at harvest was about 67.6 N. In general, a continuous loss of fruit firmness in both CA and AIR treatments was observed during the ripening period at 23 °C (Figure 1). After three days of storage at 12 °C, fruit stored under CA and AIR storage conditions showed significant differences in firmness during the first four days at 23 °C, while non-significant differences were observed at later stages of the ripening period. A comparable behavior but with greater differences was observed after 21 days at 12 °C, indicating that the main effect on fruit firmness was due to the type of storage. The differences determined between both storage conditions were statistically significant. Fruits under AIR conditions lost their firmness during storage at 12 °C and showed similar values during the ripening period. CA-treated fruit retained better the firmness than AIR-treated fruit during the first days of ripening at 23 °C. This behavior could be associated to a reduced activity of cell wall degrading enzymes, such as polygalacturonase and pectin methylesterase due to low O<sub>2</sub> concentration (Kader, 2003). Additionally, the positive effect of CA storage on the retention of firmness is supported by previous studies showing that low O<sub>2</sub> concentrations have been successful in retaining the firmness of tomato (Sozzi *et al.*, 1999; Gómez and Camelio, 2002), strawberry (Nunes *et al.* 2002) and apple (Saftner *et al.*, 2002; De Castro *et al.*, 2007). However, our results do not agree with those reported by Bender *et al.* (2000), who observed that low oxygen atmospheres were not effective in reducing softening of 'Haden' and 'Tommy Atkins' mangoes stored at 12 or 15 °C when compared to those stored under air conditions.

### Soluble Solids Content (SSC)

The SSC of fruit stored for three days at 12 °C under CA and AIR did not change significantly during the first eight days at 23 °C with values near 3.7 ° Brix (Figure 1), suggesting that the CA storage did not have an effect on SSC. After 12 days of ripening, CA-treated fruit showed significantly higher SSC values than AIR-treated fruit (4.4 and 3.8 ° Brix, respectively), which could be associated to higher starch hydrolysis due to a more advanced ripening stage. When fruit stored in AIR for 21 days at 12 °C was transferred to 23 °C, they showed higher SSC values than those stored under CA; however, fruit of both treatments had similar SSC values during the rest of the ripening period. This behavior indicates that during early stages of fruit ripening starch was hydrolyzed and the SSC increased, but once the fruit reached an advanced ripening stage, the SSC decreased due to an increase in the respiration rate. The results of SSC in both treatments were consistent with those reported by Gómez and Camelio (2002) and Batu (2003). In addition, McGlasson (2003) reported that value between 4

## Velocidades de respiración y de producción de etileno

La velocidad de respiración de las frutas a la cosecha fue de  $12.6 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , la cual disminuyó continuamente durante la maduración a  $23^\circ\text{C}$  alcanzando un valor de  $10.4 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . El pico climatérico ( $13.7 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) fue observado al tercer día de evaluación (datos no mostrados). La Figura 2 muestra que después de 21 días a  $12^\circ\text{C}$  no existieron diferencias significativas en la velocidad de respiración de ambos tratamientos, con excepción del día 4. Durante la maduración, la fruta de AC mostró una curva climatérica típica mientras que la fruta de AIRE sólo presentó una disminución continua en la producción de  $\text{CO}_2$ , lo cual puede ser atribuido a una madurez más avanzada. Este comportamiento estuvo directamente asociado con las diferencias observadas entre la fruta de AC y de AIRE para los análisis de  $\Delta E^*$  y firmeza. El almacenamiento en AC retrasó la aparición del pico climatérico y los cambios en firmeza y color externo, los cuales son indicativos de una retención de calidad de la fruta y de la prevención de cambios internos detratamentales. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Kim *et al.* (1999) al observar que frutas almacenadas en refrigeración mostraban una madurez más avanzada que aquellas almacenadas en AC ( $3 \text{ kPa O}_2$ ); la máxima velocidad de respiración obtenida por estos autores fue de  $18 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , la cual es cercana a los  $14 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  obtenidos en nuestro estudio para la fruta de AC cuando fue evaluada a  $23^\circ\text{C}$ . Efectos similares del uso de AC de bajo  $\text{O}_2$  han sido observados en otros estudios para manzana (De Castro *et al.*, 2007), pimiento (Luo and Mikitzel, 1996) y durazno (Bonghi *et al.*, 1999).

La Figura 2 muestra que la velocidad de producción de etileno fue reducida por el almacenamiento en AC después de 21 días a  $12^\circ\text{C}$ . Los valores más altos se obtuvieron para la fruta en AIRE ( $0.7 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), mientras que la fruta en AC obtuvo valores cercanos a  $0.4 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Considerando que la producción de  $\text{CO}_2$  fue continuamente eliminada del interior de los contenedores, la reducción en la producción de etileno debe ser atribuida a la baja concentración de  $\text{O}_2$  usada. Dado que el etileno ejerce sus efectos a través de reacciones metabólicas, una reducción en la actividad metabólica provocada por la baja concentración de oxígeno pudo haber atenuado el efecto de la exposición. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos durante los primeros dos días de maduración a  $23^\circ\text{C}$ . La fruta en AC mostró un aumento en los niveles de etileno al día cuatro ( $0.6 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), lo cual puede considerarse como el máximo climatérico, posteriormente estos niveles disminuyeron a los valores iniciales. La fruta en AIRE presentó una disminución en la velocidad de producción de etileno durante los primeros tres días de almacenamiento para permanecer sin cambios durante un día más y para disminuir de nuevo, un comportamiento que puede estar asociado a un estado de madurez más avanzado.

Saftner *et al.* (2002) y Kader (2003) sugirieron que

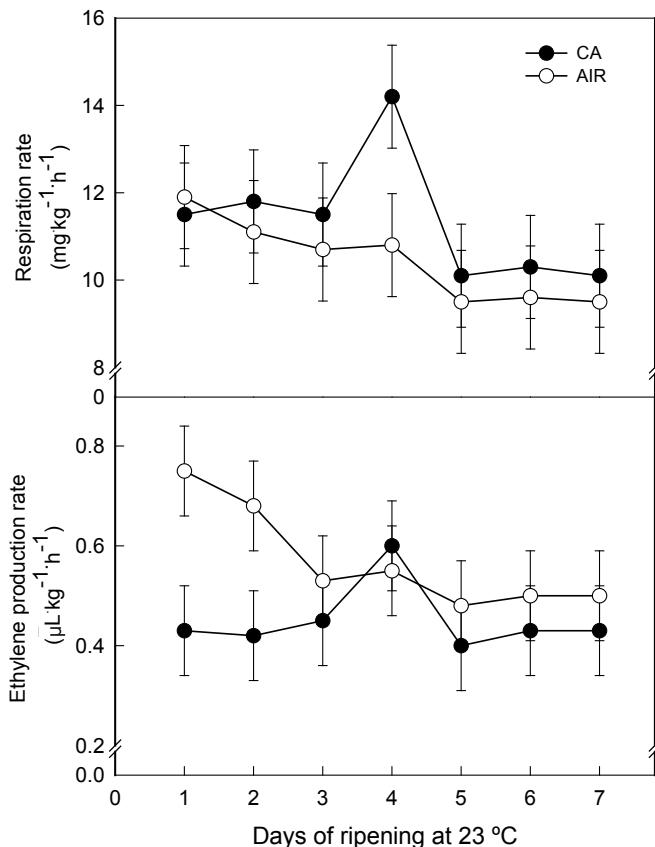


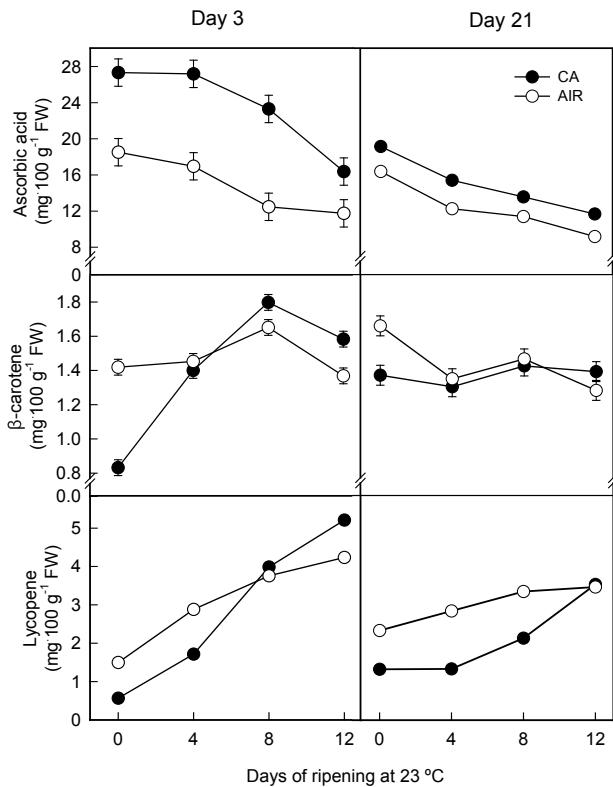
FIGURA 2. Velocidades de respiración y de producción de etileno durante la maduración a  $23^\circ\text{C}$  de tomate 'Imperial' previamente almacenado durante 21 días en condiciones de aire ambiental y AC. Cada punto representa la media de seis replicates. Las barras verticales indican LSD ( $P \leq 0.05$ ).

FIGURE 2. Respiration and ethylene production rates during ripening at  $23^\circ\text{C}$  of tomato fruits 'Imperial' previously stored for 21 days under AIR or CA conditions and then transferred to  $23^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean of six replicates. Vertical bars indicate LSD ( $P \leq 0.05$ ).

and 6 ° Brix are adequate for a good flavor in tomato.

### Ethylene production and respiration rates

The respiration rate of fruits at harvest was  $12.6 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  which decreased continuously during ripening at  $23^\circ\text{C}$  reaching a value of  $10.4 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . The climacteric peak ( $13.7 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) was observed at the third day of evaluation (data not shown). Figure 2 shows that after 21 days at  $12^\circ\text{C}$  there were no statistically significant differences in the respiration rates of both treatments, except at day 4. During ripening, CA-treated fruit showed a typical climacteric curve while AIR-treated fruit only presented a continuous decline in  $\text{CO}_2$  production, which can be attributed to their more advanced ripening stage. This behavior was directly associated with the differences observed between CA and AIR-treated fruits for  $\Delta E^*$  and firmness. CA storage of fruits delayed the climacteric respiration peak and the changes in firmness and color, which are indicative of the retention of fruit quality and the



**FIGURA 3.** Contenidos de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y lycopeno durante la maduración de tomate 'Imperial' después de su almacenamiento durante 3 y 21 días en condiciones de aire ambiental y AC. Cada punto representa la media de tres réplicas. Las barras verticales indican LSD ( $P \leq 0.05$ ).

**FIGURE 3.** Ascorbic acid, carotene and lycopene content during ripening of tomato fruits 'Imperial' after storage for 3 and 21 days under AIR or CA conditions and then transferred to 23 °C. Each point represents the mean of three replicates. Vertical bars indicate LSD ( $P \leq 0.05$ ).

el mantenimiento de la calidad de la fruta almacenada en AC está relacionado con una reducción en las velocidades de respiración y de producción de etileno. Adicionalmente, Luengwilai *et al.* (2007) reportaron que atmósferas de bajo O<sub>2</sub> (1, 3 y 5 kPa O<sub>2</sub>) son efectivas para reducir la velocidad de respiración de mandarinas 'Clemenules Clementine'. Los resultados de este estudio coinciden con estas observaciones, demostrando que el almacenamiento de tomate en AC usando 4 kPa O<sub>2</sub> (+ 96 kPa N<sub>2</sub>) a 12 °C es una alternativa útil para reducir la actividad metabólica y para extender la vida de anaquel de la fruta.

#### Contenido de ácido ascórbico y carotenoides

Los cambios en el contenido de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y lycopeno durante la maduración a 23 °C a los tres y 21 días a 12 °C se observan en la Figura 3. Despues de tres días de almacenamiento, los niveles de ácido ascórbico disminuyó aproximadamente un 40 % en ambos tratamientos durante el periodo de maduración (de 27.3 a 16.4 para la fruta de AC y de 18.5 a 11.7 mg·100 g⁻¹ PF para la de AIRE), permaneciendo más altos en los correspondientes a AC. Esta observación está de acuerdo

prevention of detrimental internal changes. These results are in agreement with those reported by Kim *et al.* (1999) who observed that fruits stored under refrigeration showed a more advanced ripening than fruits stored under CA (3 kPa O<sub>2</sub>); the maximum respiration rate obtained for those fruit was 18 mg CO<sub>2</sub>·kg⁻¹·h⁻¹ at 20 °C, which is close to the 14 mg CO<sub>2</sub>·kg⁻¹·h⁻¹ obtained in our study for the CA-treated fruit when was stored in air at 23 °C. Similar effects of low oxygen CA storage have been observed in other studies for apple (De Castro *et al.*, 2007), pepper (Luo and Mikitelz, 1996) and peach (Bonghi *et al.*, 1999).

Figure 2 shows that ethylene production rate was reduced by the CA treatment after 21 days of storage at 12 °C. The highest values were obtained for AIR-treated fruit (0.7  $\mu\text{l C}_2\text{H}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), whereas CA-treated fruit showed values near to 0.4  $\mu\text{l C}_2\text{H}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Considering that fruit CO<sub>2</sub> production was continuously eliminated inside the CA glass jars, the reduction in ethylene production rate must be attributed to the low O<sub>2</sub> concentration used. Since ethylene exerts its effects through metabolic reactions, a reduction in the metabolic activity by the low oxygen concentration may have attenuated the effect of the exposure. Significant differences between treatments were found during the first two days of ripening at 23 °C. CA-treated fruit showed an increase in ethylene levels at day four (0.6  $\mu\text{l C}_2\text{H}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), which could be considered the maximum climacteric, and then these levels decreased to the initial values. AIR-treated fruit presented a decrease in ethylene production rate during the first three days of storage to remain without changes for one more day and to decrease again, a behavior that could be associated to a more advanced ripening stage.

Saftner *et al.* (2002) and Kader (2003) suggested that maintenance of fruit quality under CA storage is related to a reduction in respiration and ethylene production rates. In addition, Luengwilai *et al.* (2007) reported that low oxygen atmospheres (1, 3 and 5 kPa O<sub>2</sub>) are effective in reducing respiration rates of Clementines Clementine mandarins. The results of this study are in agreement with these observations, demonstrating that storage of tomato under CA using 4 kPa O<sub>2</sub> (+ 96 kPa N<sub>2</sub>) at 12 °C is a useful alternative to reduce the metabolic activity and to extend the fruit shelf life.

#### Ascorbic acid and carotenoid content

The changes in ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene content during ripening of fruits at 23 °C after storage for three and 21 days at 12 °C are shown in Figure 3. After three days of storage at 12 °C, the ascorbic acid levels decreased about 40 % in both treatments during the ripening period (from 27.3 to 16.4 for CA-treated fruit and from 18.5 to 11.7 mg·100 g⁻¹ FW for AIR-treated fruit), but remained higher in CA-treated fruit.

This is in agreement with Kalt (2005) who reported that vitamin C content of fruit crops stored under CA conditions decreased at different extents in apples (25–30 %), strawberries (42 %) and raspberries (15 %). By the end

con Kalt (2005) quien reportó que el contenido de vitamina C de frutos almacenados en AC disminuía en manzanas (25 – 30 %), fresas (42 %) y frambuesas (15 %). Al final del periodo de maduración, las frutas de AC mostraron valores significativamente mayores de ácido ascórbico que las frutas de AIRE (Figura 3, día 3). Esto fue observado previamente por Kader (2003) quien reportó que atmósferas de bajo O<sub>2</sub> retuvieron el ácido ascórbico y otras vitaminas resultando en una mejor calidad nutricional. Sin embargo, Moura *et al.* (1999) encontraron que el almacenamiento de tomate por siete días a 12 °C en una atmósfera con 4 kPa de O<sub>2</sub> era suficiente para retrasar la degradación de vitamina C, lo cual no corresponde con nuestros resultados que demuestran que el almacenamiento por tres días bajo condiciones similares de AC fue suficiente para disminuir la degradación de esta vitamina.

Después de 21 días de almacenamiento a 12 °C, el efecto de la AC sobre la retención de ácido ascórbico fue menor, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que el contenido de esta vitamina era cercano a su nivel de equilibrio ya que no cambió significativamente el resto del periodo de maduración (Figura 3). A pesar de que el contenido de esta vitamina disminuyó continuamente durante la maduración en ambas condiciones de almacenamiento, las diferencias en sus niveles fueron similares durante el periodo de maduración. Estos resultados indican que para un tiempo de almacenamiento a 12 °C, el efecto principal sobre el contenido de ácido ascórbico puede ser atribuido al tipo de almacenamiento (AC o AIRE). Los contenidos de ácido ascórbico de las frutas de AC variaron de 19.1 a 11.6 mg·100 g<sup>-1</sup> PF, mientras que los de la fruta de AIRE variaron de 16.3 a 9.15 mg·100 g<sup>-1</sup> PF. Aunque las pérdidas de ácido ascórbico fueron significativas en la fruta almacenada en AC, los valores finales fueron cercanos a los reportados por McGlasson (2003) para tomate rojo maduro. Estos resultados sugieren que la AC retuvo por más tiempo el contenido de ácido ascórbico, resultando en frutas con una mejor calidad nutricional. El ácido ascórbico es muy inestable debido principalmente a la actividad de la enzima ácido ascórbico oxidasa y su reacción con oxígeno en presencia de iones metálicos y luz (Lee and Kader, 2000).

El ácido ascórbico es oxidado reversiblemente para formar ácido dehidroascórbico, que también exhibe actividad biológica, pero es muy inestable y se oxida rápidamente a ácido dicetogulónico que no presenta actividad biológica. Esta reacción puede ser catalizada por ascorbato oxidasa, una enzima abundante en vegetales. La baja degradación de ácido ascórbico obtenida en este estudio en las frutas de AC puede deberse a una reducida actividad de ascorbato oxidasa y ascorbato peroxidasa que requieren altas concentraciones de O<sub>2</sub> para funcionar (Zou *et al.*, 2006).

El contenido de β-caroteno a la cosecha fue de 0.42 mg·100 g<sup>-1</sup> PF. Después de tres días de almacenamiento a 12 °C, las frutas de AC tuvieron un contenido significativamente

of the ripening period, CA-treated fruits showed significantly higher ascorbic acid values ( $P = 0.05$ ) than AIR-treated fruits (Figure 3, day 3). This was previously observed by Kader (2003) who reported that low O<sub>2</sub> atmospheres retained ascorbic acid and other vitamins resulting in better nutritional quality of fruits and vegetables. However, Moura *et al.* (1999) found that the storage of tomato for seven days at 12 °C in an atmosphere containing 4 kPa O<sub>2</sub> was insufficient to delay vitamin C degradation, which does not correspond with our results showing that storage for three days under similar CA conditions was sufficient to decrease the degradation of this vitamin.

After 21 days of storage at 12 °C, the effect of the CA storage on ascorbic acid retention was smaller, which could be related to the fact that the content of this vitamin was close to its steady state level since it did not change significantly during the rest of the ripening period (Figure 3). Despite the content of this vitamin decreased continuously during ripening in both treatments, the differences in their levels were similar during the ripening period. These results indicate that for a given time of storage at 12 °C, the main effect on ascorbic acid can be attributed to the type of storage (CA or AIR). The ascorbic acid contents of CA-treated fruits varied from 19.1 to 11.6 mg·100 g<sup>-1</sup> FW, whereas those of AIR-treated fruits varied from 16.3 to 9.15 mg·100 g<sup>-1</sup> FW. Although ascorbic acid losses were significant in fruit stored under CA, the final values were close to those reported by McGlasson (2003) for red ripe tomato. These results suggest that CA storage retained longer the ascorbic acid content, resulting in fruits with a better nutritional quality. Ascorbic acid is quite unstable mainly due to the activity of ascorbic acid oxidase and its reaction with oxygen in the presence of heavy metal ions and light (Lee and Kader, 2000).

Ascorbic acid is reversibly oxidized to form dehydroascorbic acid, which also exhibits biological activity, but it is very unstable and quickly oxidizes to diketogulonic acid, a non-biological active compound. This oxidative reaction could be catalyzed by ascorbate oxidase, an abundant enzyme in vegetables. The lower ascorbic acid degradation in CA-treated fruits obtained in this study could be due to a reduced activity of ascorbate oxidase and ascorbate peroxidase, which require high O<sub>2</sub> concentrations to function (Zou *et al.*, 2006).

The β-carotene content at harvest was 0.42 mg·100 g<sup>-1</sup> FW. After three days of storage at 12 °C, CA-treated fruits had a significantly lower ( $P \leq 0.05$ ) β-carotene content (0.8 mg·100 g<sup>-1</sup> FW) than those stored in AIR (1.4 mg·100 g<sup>-1</sup> FW) (Figure 3); by the end of the ripening period the β-carotene levels for both treatments were closer, but significantly different. Vicente *et al.* (2009) reported that the synthesis of carotenoids can continue after harvest in tomatoes, peaches and carrots. Our results are in agreement with these observations and suggest that three days of storage under CA were sufficient to delay the

menor ( $P \leq 0.05$ ) de  $\beta$ -caroteno (0.8 mg·100 g<sup>-1</sup> PF) que las almacenadas en AIRE (1.4 mg·100 g<sup>-1</sup> PF) (Figura 3); al final del periodo de maduración los niveles de ambos tratamientos fueron muy cercanos, pero significativamente diferentes. Vicente *et al.* (2009) reportaron que la síntesis de carotenoides puede continuar después de la cosecha en tomates, duraznos y zanahorias. Nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones y sugieren que tres días de almacenamiento bajo AC fueron suficientes para retrasar la síntesis de  $\beta$ -caroteno; además, su producción no fue afectada por la baja concentración de oxígeno usada una vez que la fruta fue transferida a 23 °C, resultando en tomates con una buena calidad nutricional.

Después de 21 días de almacenamiento a 12 °C, la fruta almacenada en AIRE observó una reducción en el contenido de  $\beta$ -caroteno desde 1.65 a 1.3 mg·100 g<sup>-1</sup> PF durante la maduración, mientras que aquélla almacenada en AC tuvo valores muy similares (aproximadamente 1.35 mg·100 g<sup>-1</sup> PF) (Figura 3). Estudios previos de la maduración de tomate reportaron un aumento en los niveles de carotenoides, principalmente licopeno, y de provitaminas como la provitamina A ( $\beta$ -caroteno) (De Azevedo y Rodriguez-Amaya, 2005; Kalt, 2005; Mejia-Torres *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron diferencias significativas sólo cuando la fruta fue removida del primer almacenamiento, indicando que el efecto principal sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno puede ser atribuido al tipo de almacenamiento (AC o AIRE). El bajo contenido de  $\beta$ -caroteno observado en la fruta de AC al inicio del periodo de maduración puede atribuirse a una baja actividad de la enzima licopeno  $\beta$ -ciclasa que cataliza la conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno (Pecker *et al.*, 1996), provocada por la reducida concentración de O<sub>2</sub> usada.

Debido a su alto consumo, el tomate es una fuente importante de licopeno, que representa aproximadamente el 75 % del contenido total de carotenoides (Kalt, 2005). El licopeno fue el carotenoide más abundante y sus valores oscilaron entre 0.11 y 5.2 mg·100 g<sup>-1</sup> PF durante la maduración de la fruta almacenada por tres días a 12 °C, mientras que para la fruta almacenada por 21 días a 12 °C los valores estuvieron entre 1.3 y 3.7 mg·100 g<sup>-1</sup> PF. El valor más alto observado en este estudio fue menor a aquellos reportados para cuatro cultivares de tomate de México, pero se ubicó en el rango reportado para cultivares de otros países (0.04 a 10.64 mg·100 g<sup>-1</sup>) (Hanson *et al.*, 2004). Como se muestra en la Figura 3, un aumento en el contenido de licopeno fue observado para ambas condiciones de almacenamiento. Después de tres días de almacenamiento a 12 °C, la fruta de AC tuvo muy bajo contenido de licopeno durante los primeros cuatro días de maduración a 23 °C, lo cual indica que las bajas condiciones de oxígeno inhibieron la producción. Sin embargo, este efecto se perdió gradualmente y para el final del periodo de maduración, la fruta de AC tuvo un contenido mayor al de la fruta almacenada en AIRE. Thompson *et al.* (2000) reportaron incrementos similares en el contenido

synthesis of  $\beta$ -carotene; in addition, its production was not affected by the low oxygen concentration used once the fruit was transferred to 23 °C, resulting in tomatoes with a good nutritional quality.

After 21 days of storage at 12 °C, a reduction in  $\beta$ -carotene content from 1.65 to 1.3 mg·100 g<sup>-1</sup> FW was observed during ripening of AIR-treated fruit, while those previously stored under CA showed very similar values (about 1.35 mg·100 g<sup>-1</sup> FW) during the ripening period (Figure 3). Previous studies of tomato fruit maturation have reported an increase in carotenoid levels, mainly lycopene, and provitamins such as provitamin A ( $\beta$ -carotene) (De Azevedo and Rodriguez-Amaya, 2005; Kalt, 2005; Mejia-Torres *et al.*, 2009). Our results showed significant differences ( $P = 0.05$ ) only when the fruit was removed from the first storage, indicating that the main effect on  $\beta$ -carotene content can be attributed to the type of storage (CA or AIR). The smaller  $\beta$ -carotene content observed in CA-treated fruit at the beginning of the ripening period could be attributed to a lower activity of the enzyme lycopene  $\beta$ -cyclase which catalyzes the conversion of lycopene to  $\beta$ -carotene (Pecker *et al.*, 1996), due to the reduced O<sub>2</sub> concentration used.

Because of its high consumption, tomato is an important source of lycopene, which represents about 75 % of the total carotenoid content (Kalt, 2005). Lycopene was the major carotenoid and the values ranged from 0.11 to 5.2 mg·100 g<sup>-1</sup> FW during ripening of fruit stored for three days at 12 °C, while for fruit stored for 21 days at 12 °C the values were between 1.3 and 3.7 mg·100 g<sup>-1</sup> FW. The highest value observed in this study was lower than those reported for four tomato cultivars from Mexico, but it was in the range reported for cultivars (0.04 to 10.64 mg·100 g<sup>-1</sup>) from other countries (Hanson *et al.*, 2004). As shown in Figure 3, an increase in lycopene content was observed for CA and AIR treatments. After three days of storage at 12 °C, CA-treated fruits showed a very low lycopene content during the first four days of the ripening period at 23 °C, which indicates that low oxygen conditions inhibited lycopene production. However, this effect was gradually lost and by the end of the ripening period, CA-treated fruits had a higher content than those stored under AIR conditions. Thompson *et al.* (2000) reported similar increases in the lycopene content during fruit ripening of four tomato cultivars, with values near to 5 mg·100 g<sup>-1</sup> FW at the red-ripe stage, which are similar to those observed in this study.

A delay in lycopene accumulation was observed during ripening of fruit previously stored for 21 days at 12 °C, although the differences between treatments were greater than those observed at day three (Figure 3). CA-treated fruit showed lower and significant ( $P \leq 0.05$ ) lycopene content during the first 8 days of ripening; nevertheless, after 12 days at 23 °C both treatments had similar values. This suggests that although CA storage was able to delay lycopene synthesis, this was not affected in a negative way at the end of ripening. This behavior was previously

de licopeno durante la maduración de cuatro cultivares de tomate, con valores cercanos a 5 mg·100 g<sup>-1</sup> PF en la etapa de rojo-maduro, los cuales son similares a los observados en este estudio.

Se observó un retraso en la acumulación de licopeno durante la maduración de la fruta previamente almacenada por 21 días a 12 °C, aunque las diferencias entre tratamientos fueron mayores que las observadas al día tres (Figura 3). La fruta de AC tuvo un contenido de licopeno menor y significativo ( $P \leq 0.05$ ) durante los primeros ocho días de maduración; no obstante, después de 12 días a 23 °C ambos tratamientos tuvieron valores similares. Esto sugiere que aunque el almacenamiento en AC fue capaz de retrasar la síntesis de licopeno, esto no afectó negativamente al final de la maduración. Este comportamiento fue observado previamente por Sozzi *et al.* (1999) al almacenar frutos de tomate en aire o en AC (3 kPa O<sub>2</sub> + 20 kPa CO<sub>2</sub>), encontrando un aumento en el contenido de licopeno en ambas condiciones; sin embargo, ellos reportaron que la fruta de AC no alcanzó el mismo color rojo que las almacenadas en aire. Nuestros resultados no concuerdan con estas observaciones debido a que las frutas almacenadas en AIRE y en AC (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) alcanzaron un color rojo similar. El contenido de licopeno incrementó durante la maduración de la fruta como consecuencia de la reducida ciclización y de la presencia de actividad de fitoeno sintasa promovida por la maduración (Fraser *et al.*, 2002). En este estudio, la síntesis reducida de licopeno en la fruta de AC puede atribuirse a una actividad reducida de las enzimas fitoeno desaturasa y Z-caroteno desaturasa, que catalizan la conversión de fitoeno a licopeno en reacciones dependientes de oxígeno (Beyer *et al.*, 1994).

## CONCLUSIONES

El almacenamiento en atmósferas controladas (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub> at 12 °C) fue efectivo para retrasar los cambios de color, las velocidades de respiración y de producción de etileno, la maduración y para mantener la firmeza de tomate 'Imperial'. Después de 21 días de almacenamiento a 12 °C, el uso de bajo oxígeno disminuyó la degradación de ácido ascórbico y afectó positivamente la síntesis de β-caroteno y licopeno. Basado en la apariencia externa, la retención de firmeza y la calidad nutricional, se puede concluir que el almacenamiento en AC es una alternativa útil para extender la vida de anaquel y el periodo de comercialización de tomate cultivar 'Imperial', permitiendo almacenar la fruta por 21 días a 12 °C seguido de un periodo de maduración comercial de 12 días a 23 °C; por lo que los productores y distribuidores tendrán más tiempo para posicionar sus frutos en mercados distantes.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa y por el Programa de

observed by Sozzi *et al.* (1999) who stored tomato fruits on air or CA (3 kPa O<sub>2</sub> + 20 kPa CO<sub>2</sub>), finding an increase in lycopene content under both storage conditions; however, they reported that CA fruits did not reach the same red color than those stored in air. Our results are not in agreement with these observations because fruit stored under AIR and CA (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub>) reached a similar red color. Lycopene content increases during tomato fruit ripening as a consequence of reduced lycopene cyclization and the presence of a ripening enhanced phytoene synthase activity (Fraser *et al.*, 2002). In this study, the reduced synthesis of lycopene in CA-treated fruits could be attributed to a reduced activity of the enzymes phytoene desaturase and Z-carotene desaturase, which catalyze the conversion of phytoene to lycopene in oxygen dependent reactions (Beyer *et al.*, 1994).

## CONCLUSIONS

Controlled atmosphere storage (4 kPa O<sub>2</sub> + 96 kPa N<sub>2</sub> at 12 °C) was effective in delaying color changes, respiration rate and ethylene production rate, ripening and maintained the firmness of tomato fruit 'Imperial'. After 21 days of storage at 12 °C, the use of low oxygen conditions decreased ascorbic acid degradation and affected positively β-carotene and lycopene synthesis. Based on external appearance, retention of firmness and nutritional quality, it can be concluded that CA storage is a useful alternative to extend the shelf life and the marketing period of tomato fruit 'Imperial', allowing to store the fruits for 21 days at 12 °C followed by a commercial ripening period of 12 days at 23 °C; thereby producers and sellers have more days to position their fruits at distant markets.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología -Sinaloa and Programa de Mejoramiento del Profesorado-Secretaría de Educación Pública. JVJ was the recipient of a scholarship from CONACYT-Mexico.

*End of English Version*

Mejoramiento del Profesorado-Secretaría de Educación Pública. JVJ recibió una beca de Maestría de CONACYT-México.

## LITERATURA CITADA

- BATU, A. 2003. Temperature effects on fruit quality of mature green tomatoes during controlled atmosphere storage. International Journal of Food Science and Nutrition 54: 201-208.
- BENDER, R. J.; BRECHT, J. K.; SARGENT, S. A.; HUBER, D. J. 2000. Mango tolerance to reduced oxygen levels in

- controlled atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 707-713.
- BEYER, P.; NIEVELSTEIN, V.; ALBABILI, S.; BONK, M.; KLEINIG, H. Biochemical aspects of carotene desaturation and cyclization in chromoplast membranes from *Narcissus pseudonarcissus*. *Pure and Applied Chemistry* 66: 1047-1056.
- BONGHI, C.; RAMINA, A.; RUPERTI, B.; VIDRIH, R.; TONUTTI, P. 1999. Peach fruit ripening and quality relation to picking time, and hypoxic and high CO<sub>2</sub> short-term postharvest treatments. *Postharvest Biology and Technology* 16: 213-222.
- BRAMLEY, P. M. 1997. The regulation and genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in tomato fruit. *Pure and Applied Chemistry* 69: 2159-2162.
- COLLINS, J. K.; PERKINS-VEAZIE, P.; ROBERTS, W. 2006. Lycopene: from plants to humans. *HortScience* 41: 1135-1144.
- CRISOSTO, C. H.; GARNER, D.; CRISOSTO, G. 2002. High carbon dioxide atmosphere affect stored 'Thompson Seedless' table grape. *HortScience* 37: 1074-1078.
- DE AZEVEDO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 2005. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 591-597.
- DE CASTRO, E.; BIASI, W. V.; MITCHAM, E. J. 2007. Quality of 'Pink Lady' apples in relation to maturity at harvest, prestorage treatments, and controlled atmosphere during storage. *HortScience* 42:605-610.
- FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KYANO, J. W.; MISAWA, N.; DRAKE, R. G.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 1092-1097.
- GÖKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMİR, N.; ACAR, J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography* 881: 309-316.
- GÓMEZ, P. A.; CAMELO, A. F. 2002. Postharvest quality of tomato fruits stored under controlled atmospheres. *Horticultura Brasileira* 20: 38-43.
- HANSON, P. M.; YANG, R.; WU, J.; CHEN, J.; LEDESMA, D.; TSOU, S. C. 2004. Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129: 704-711.
- KADER, A. A. 2003. Physiology of CA treated produce. *Acta Horticulturae* 600: 349-354.
- KALT, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science* 70: 11-19.
- KIM, J.; SOLOMOS, T.; GROSS, K. 1999. Changes in cell wall galactosyl and soluble galactose content in tomato fruit stored in low oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* 17: 33-38.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20: 207-220.
- LUENGWILAI, K.; SUKJAMSAI, K.; KADER, A. A. 2007. Responses of Clementines Clementine and W. Murcott mandarins to low oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* 44: 48-54.
- LUO, Y.; MIKITZEL, L. J. 1996. Extension of postharvest life of Bell peppers with low oxygen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70: 115-119.
- MCGLASSON, B. 2003. Tomatoes, pp. 5800-5808. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. CABALLERO, B.; TRUGO, L.C.; FINGLAS, P.M. (eds.). Academic Press, Inc., New York, USA.
- MEJÍA-TORRES, S.; VEGA-GARCÍA, M.; VALVERDE-JUÁREZ, J.; LÓPEZ-VALENZUELA, J.; CARO-CORRALES, J. 2009. Effect of wax application on the quality, lycopene content and chilling injury of tomato fruit. *Journal of Food Quality* 32: 735-746.
- MOURA, M. L.; SARGENT, S. A.; OLIVEIRA, R. F. 1999. Effect of controlled atmosphere on storage of tomatoes harvested at breaker stage. *Science Agriculture* 56: 135-142.
- NISHIYAMA, I.; YAMASHITA, Y.; YAMANAKA, M.; SHIMOHASHI, A.; FUKUDA, T.; OOTA, T. 2004. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5472-5475.
- NUNES, M. C.; MORAIS, A. M.; BRECHT, J. K.; SARGENT, S. A. 2002. Fruit maturity and storage temperature influence response of strawberries to controlled atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 836-842.
- PECKER, I.; GABBAY, R.; CUNNINGHAM, F.; HIRSCHBERG, J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 30: 807-819.
- SAFTNER, R. A.; ABBOTT, J. A.; CONWAY, W. S.; BARDEN, C. L.; VINYARD, B. T. 2002. Instrumental and sensory quality characteristics of 'Gala' apples in response to prestorage heat, controlled atmosphere, and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 1006-1012.
- SAGARPA, 2007. Centro de Estadísticas Agropecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Subdelegación Agropecuaria, Culiacán, Sinaloa. México.
- SHI, J. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:1-42.
- SIMONNE, A. H.; BEHE, B. K.; MARSHALL, M. M. 2006. Consumers prefer low-priced and high-lycopene-content fresh-market tomatoes. *HortTechnology* 16: 674-681.
- SOZZI, G. O.; TRINCERO, G. D.; FRASCHINA, A. A. 1999. Controlled atmosphere storage of tomato fruit: low oxygen or elevated carbon dioxide levels alters galactosidase activity and inhibit exogenous ethylene action. *Journal of Science of Food and Agriculture* 79: 1065-1070.
- THOMPSON, K. A.; MARSHALL, M. R.; SIMS, C. A.; WEI, C. I.;

- SARGENT, S. A.; SCOTT, J. W. 2000. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science* 65: 791-795.
- VICENTE, A. R.; MANGANARIS, G. A.; SOZZI, G. O.; CRISOSTO, C. H. 2009. Nutritional quality of fruits and vegetables, pp. 58-93. *In: Postharvest handling: a system approach.*
- FLORKOWSKI, W.J.; SHEWFELT, R.L.; BRUECKNER, B.; PRUSIA, S.E. (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA.
- ZOU, L.; LI, H.; OUYANG, B.; ZHANG, J.; YE, Z. 2006. Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Science* 170: 120–127.