

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA REFRIGERACIÓN EN EL AROMA DE
JITOMATE (*Solanum lycopersicum*).**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez

Comité tutorial:

Asesor: **Dr. Héctor B. Escalona Buendía**

Asesor: **Dr. Francisco J. Fernández Perrino**

Co-directora: **Dra. Clara Pelayo Zaldívar**

Co-directora: **Dra. Laura J. Pérez Flores**

México D. F. enero de 2009

El Doctorado en Biología experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa con el número de registro 0904-0, se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Esta tesis se realizó en laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Departamento de Ciencias de la Salud; División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Laura J. Pérez Flores y la Dra. Clara Pelayo Zaldívar con la asesoría del Dr. Hector B. Escalona Buendía y del Dr. Francisco J. Fernández Perrino.

COMITÉ TUTORIAL

Asesor

Dr. Héctor B. Escalona Buendía

CIATEJ

hescalona@ciatej.net.mx

Asesor

Dr. Francisco J. Fernández Perrino

Departamento de Biotecnología. UAM-I

fjfp@xanum.uam.mx

Co-directora

Dra. Clara Pelayo Zaldívar

Departamento de Biotecnología. UAM-I

cpel@xanum.uam.mx

Co-directora

Dra. Laura J. Pérez Flores

Departamento de Ciencias de la salud UAM-I

ljpf@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Efecto de la refrigeración en el aroma de jitomate (*Solanum lycopersicum*)**”. Por Fernando Díaz de León Sánchez quien realizó la disertación pública el 30 de enero de 2009, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Presidente

Dr. Francisco J. Fernández Perrino

Secretario

Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal

Dra. Mónica Ponce Valadez

Vocal

Dr. Fernando Rivera Cabrera

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haberme otorgado una beca, la que me permitió realizar esta investigación, para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental. Becario No. 193037.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por otorgarme una beca para Estudios de Posgrado para realizar los estudios correspondientes al Doctorado en Biología Experimental.

Este proyecto se llevó a cabo con financiamiento de la UAM, del PROMEP Red CA (UAM-I, UNACH y UC-DAVIS) y al cuerpo académico Ciencia y Tecnología de Plantas (UAM-I CA26) y del CONACYT: apoyo complementario a investigadores en proceso de consolidación 2006, y por el apoyo al Doctorado en Biología Experimental “Efecto de la refrigeración en el aroma de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) durante el climaterio y postclimaterio” (No. 66952).

AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras Laura J. Pérez Flores y Clara Pelayo Zaldívar por su dirección y sus valiosos consejos, para la realización de la parte experimental del proyecto y por su apoyo y paciencia durante la escritura del artículo y la tesis.

A los Doctores Héctor B. Escalona Buendía, Francisco J. Fernández Perrino, Mónica Ponce Valadez y Fernando Rivera Cabrera por sus valiosas aportaciones, disponibilidad y paciencia para revisar y corregir el presente trabajo.

Al Químico Adolfo García Osuna por sus consejos y asesoría en el análisis, mediante cromatografía de gases, del perfil químico del aroma de jitomate.

A la Dra. Mónica Ponce Valadez y a la M. en Biol. Exp. Xochil Avila Alejandre por su apoyo en la implementación de algunas técnicas de la parte experimental del presente proyecto.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM-I.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor a mis dos grandes amores Carito y Marifer por su apoyo, paciencia y comprensión durante el desarrollo de este trabajo. Las quiero mucho.

Con todo mi amor a mi mamá y a mi papá que siempre me han apoyado. Gracias por toda su dedicación y amor.

A mis hermanos Rosa María, María del Carmen y Francisco Javier y a mis sobrinos Selene, María Rosa del Carmen y Xavier con quienes siempre he compartido los momentos más importantes de mi vida.

A mis cuñados Ruth y José Francisco por su apoyo.

A todos los miembros del Laboratorio S-253 (Marcelo, Bety, Fernando, Mónica, Lluvia de Abril, Estrella, Juan Manuel, Julio Cesar, Xochil, Esther, Sarai, Fulgencio, Maribel, Lucy, Adriana, Tere, Elsa, Magali, Lizbeth, Xochiquetzal) por su gran amistad y apoyo que me ayudaron para la culminación del presente trabajo.

A mis amigos Ángeles, Judith, Trini, Olivia, Juan, Laura, Clara, Adolfo, así como a todos los que he olvidado incluir muchas gracias por su apoyo

1 ANTECEDENTES	
1.1 Importancia del jitomate.....	4
1.2 Breve historia del jitomate.....	5
1.3 Características del jitomate	
1.3.1 Anatomía.....	7
1.3.2 Composición química.....	8
1.4 Etileno y la maduración del jitomate.....	9
1.5 Parámetros de calidad.....	13
1.6 Sabor y aroma.....	14
1.6.1 Componentes del sabor en jitomate.....	16
1.6.2 Técnicas para determinar compuestos volátiles del aroma	
1.6.2.1 Análisis del espacio de cabeza en equilibrio dinámico.....	17
1.6.2.2 Micro extracción en fase sólida.....	18
1.6.3 Análisis sensorial del jitomate y su correlación con la calidad.....	22
1.6.3.1 Métodos sensoriales.....	22
1.6.3.1.1 Pruebas o métodos discriminativos.....	23
1.6.3.1.2 Pruebas descriptivas.....	24
1.6.4 Biosíntesis de compuestos volátiles en jitomate	
1.6.4.1 Rutas metabólicas de síntesis.....	29
1.6.4.2 Enzimas clave en la biosíntesis de compuestos del aroma en Jitomate.....	33
1.7 Almacenamiento de jitomate.....	35
1.8 Factores que afectan la generación de aroma en jitomate.....	37
1.8.1 Etileno y producción de aromas.....	38
1.8.2 Cambios en aromas durante el almacenamiento de jitomate.....	39
1.9 Efecto de la refrigeración en las rutas de biosíntesis de aromas (o en sus enzimas) en frutos.....	40
1.10 Avances en el mejoramiento genético de la calidad sensorial del Jitomate.....	42
2 JUSTIFICACIÓN.....	45
3 OBJETIVOS	
3.1 GENERAL.....	47
3.2 PARTICULARES.....	47

4 HIPÓTESIS	48
5 MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Material biológico y tratamientos.....	49
5.2 Diseño experimental.....	49
5.3 Pérdida de peso (PP).....	50
5.4 Determinación de parámetros de calidad	
5.4.1 Color.....	50
5.4.2 Firmeza.....	51
5.4.3 Sólidos solubles totales (SST).....	51
5.4.4 Acidez titulable (AT).....	52
5.4.5 Azúcares reductores y totales	
5.4.5.1 Azúcares reductores.....	52
5.4.5.2 Azúcares totales.....	52
5.5 Determinación de etileno y actividad respiratoria	
5.5.1 Procedimiento de análisis.....	53
5.5.2 Condiciones cromatográficas.....	53
5.6 Análisis químico de los compuestos volátiles del aroma de jitomate.....	54
5.6.1 Condiciones cromatográficas.....	55
5.6.2 Identificación de los compuestos volátiles.....	56
5.6.3 Condiciones cromatográficas para la identificación de compuestos Volátiles.....	57
5.7 Cuantificación de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenada.....	
5.7.1 Extracción de la enzima.....	58
5.7.2 Actividad de la enzima.....	58
5.8 Expresión del gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa2 (ADH2)	
5.8.1 Extracción de ARN total.....	59
5.8.2 Cebadores.....	60
5.8.3 Amplificación por RT-PCR.....	60
5.9 Evaluación sensorial del aroma y sabor del jitomate.....	
5.9.1 Entrenamiento de jueces para las pruebas de evaluación sensorial..	61
5.9.2 Pruebas de evaluación sensorial.....	63
5.10 Análisis estadístico.....	65

6 RESULTADOS	
6.1 Variedad W4043.....	66
6.1.1 Pérdida de peso (PP).....	66
6.1.2 Parámetros de calidad.....	66
6.1.3 Etileno y actividad respiratoria.....	70
6.1.4 Efecto de la temperatura en los niveles de compuestos volátiles.....	71
6.2 Variedad 7705.....	77
6.2.1 Pérdida de peso (PP).....	77
6.2.2 Parámetros de calidad.....	78
6.2.3 Etileno y actividad respiratoria.....	83
6.2.4 Efecto de la temperatura en los compuestos volátiles del aroma.....	84
6.2.5 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima ADH.....	89
6.2.6 Efecto de la temperatura en la expresión del gen que codifica para la enzima ADH2.....	91
6.2.7 Efecto de la temperatura en el aroma evaluado sensorialmente.....	92
7 DISCUSIÓN.....	99
8 CONCLUSIONES.....	106
9 PERSPECTIVAS.....	108
10 BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXO 1.....	123
ANEXO 2.....	130
ANEXO 3.....	167

1 ANTECEDENTES

1.1 Importancia del jitomate

El jitomate (*Solanum lycopersicum* conocido anteriormente como *Lycopersicon esculentum* Mill.) es una hortaliza muy popular en todo el mundo. Esta popularidad se debe a su color atractivo, valor nutricional, aroma y versatilidad de uso. Es un fruto que se puede consumir crudo o como ingrediente de una gran variedad de alimentos y bebidas. El jitomate puede ser procesado solo o incorporado a varios alimentos para posteriormente ser enlatado, congelado, preservado o deshidratado (Rick, 1978; Hobson y Grierson, 1993).

A pesar de su bajo contenido energético (dos frutos medianos aportan unas 22 calorías), el jitomate es benéfico para la salud del ser humano debido al aporte nutricional a su dieta, siendo en ocasiones la principal fuente de diversos macronutrientes, como el potasio y el magnesio. De su contenido en vitaminas se destacan la B1, B2, B5 y C. El jitomate es rico en carotenoides como el licopeno, este último es el pigmento que da el color rojo característico y al igual que la vitamina C, tiene carácter antioxidante (Yilmaz, 2001).

Los niveles de licopeno se incrementan durante el proceso de maduración de los frutos conforme los cloroplastos se transforman en cromoplastos. En el jitomate más comercial, el licopeno se encuentra en una concentración de 3.1-7.7 mg/100 g de fruto maduro. En los últimos años, se han incrementado los reportes donde se menciona al licopeno como importante en la salud humana, otorgándole un papel relevante en la prevención de ciertos tipos de cáncer, especialmente el de

próstata (Giovannuci, 1999 y 2005; Nguyen y Schwartz, 1999; Bramley, 2000; Ellinger y col., 2006).

Por lo anterior, el jitomate es una hortaliza con una amplia industria agrícola, cuya producción se incrementa año con año. En el mundo, en el año 2007 se produjeron alrededor de 126,246,708 toneladas (Mt), siendo los principales países productores China, Estados Unidos de Norteamérica, Turquía, India, Italia, Egipto, España, Brasil, Irán y México (FAOSTAT Database Results, 2008).

El jitomate es una importante fuente de ingresos económicos para nuestro país. México produce principalmente variedades de jitomate rojo del tipo saladette, cherry y bola. En el año 2007, de las 2,900,000 toneladas producidas en una superficie de 130,000 hectáreas (FAOSTAT Database Results, 2008), gran parte se exportó principalmente hacia los Estados Unidos de Norteamérica. Sinaloa es el estado más importante para la producción de jitomate en nuestro país (alrededor del 40% de la producción total), seguido por Baja California Norte, San Luís Potosí y Michoacán.

1.2 Breve historia del jitomate

El jitomate es originario de la región andina que hoy comparten Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú. De ahí se distribuyó por varias regiones de América hasta llegar a México, donde probablemente fue domesticado y alcanzó gran popularidad. Sin embargo, no hay pruebas definitivas que apoyen que fue domesticado en nuestro país (Peralta y col., 2006).

El jitomate carece de nombre nativo en la región andina, en tanto que en México se le conoce en lengua náhuatl como *tomatl*, término que es sin duda el origen del nombre moderno.

Las primeras crónicas sobre América son escasas en sus referencias a los jitomates. El cronista peruano Guamán Poma menciona el consumo esporádico del fruto del jitomate silvestre en el imperio Inca.

El jitomate alcanzó un avanzado estado de domesticación antes de ser conocido en Europa. Fueron los españoles después de la conquista quienes regresaron con la semilla a España, desde donde se distribuyó rápidamente por los países mediterráneos (España, Portugal e Italia) y posteriormente por toda Europa (Rick, 1978; Yilmaz, 2001). En Francia fue conocido como la “manzana del amor” y en Alemania como la “manzana del paraíso”. Éstos y otros nombres equivalentes persistieron hasta mediados del siglo XIX. La primera mención del jitomate en Europa fue en el año 1554, por el herborista Pietro Andrea Mattioli, el cual afirmaba que el jitomate se comía en Italia con sal y pimienta (Peralta y col., 2006).

Como el jitomate está emparentado con plantas venenosas como la belladona y la mandrágora, en un principio ni la planta ni su fruto tuvieron gran aceptación en Inglaterra y Estados Unidos, y sólo se le utilizaba al jitomate como planta ornamental o como medicina (Rick, 1978).

El jitomate pertenece a la familia Solanaceae, la cual incluye más de 3000 especies. La clasificación filogenética de las Solanaceae fue revisada recientemente y el género *Lycopersicum* se reintegró al género *Solanum*. En la actualidad el jitomate cultivado (*S. lycopersicum*) y otras 12 especies silvestres

emparentadas pertenecen al género *Solanum* sección *Lycopersicum* (Peralta y col., 2006).

1.3 Características del jitomate

1.3.1 Anatomía

El jitomate se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperaturas y métodos de cultivo. Sin embargo, se adapta mejor a ambientes cálidos, con buena iluminación y drenaje. Es, además, una planta relativamente tolerante a la salinidad.

La planta de jitomate es perenne, pero se cultiva como anual. Semeja un arbusto que crece hasta 3 m de altura, con un tallo débil, pudiendo desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Las hojas tienen de 10 a 25 cm de largo, pinnadas con 5 a 9 folíolos, cada folíolo tiene aproximadamente 8 cm de largo, con márgenes serrados. Las flores son amarillas, miden de 1 a 2 cm, con cinco lóbulos en la corola; crecen en racimos de 3 a 12 flores (Rick, 1978).

El fruto es una baya suave de 1 a 2 cm de diámetro en las plantas silvestres y es mucho más grande en las variedades cultivadas. El jitomate cherry tiene entre 1 y 2 cm de diámetro, mientras que en los jitomates de tipo bola el diámetro alcanza más de 10 cm; los frutos de la variedad que más ampliamente se comercializa en el mundo tienen entre 5 y 6 cm de diámetro. Por lo común, tienen forma redondeada o elipsoidal. La mayoría de los cultivares producen frutos rojos, pero algunos producen frutos de color amarillo, púrpura y rayados (Rick, 1978). El cuerpo del fruto se desarrolla a partir de la pared del ovario y es reconocido como el pericarpio, el cual está formado de paredes externas, radiales e internas. Estas

paredes forman lóculos o cavidades en el pericarpio, que contienen las semillas embebidas en un tejido parenquimatoso de apariencia gelatinosa que se origina a partir de la placenta. El número de lóculos es variable y característico de cada variedad (Hobson y Davies 1980).

Algunas variedades presentan crecimiento limitado (variedades determinadas) y tienen un desarrollo menos progresivo de hojas, nódulos por segmento y terminan con una inflorescencia (así los frutos en estas variedades se cosechan sincronizadamente en un periodo corto de tiempo). Las otras variedades, que son la mayoría, presentan un crecimiento ilimitado (variedades indeterminadas) y poseen un tallo que en lugar de hojas presenta nódulos y una inflorescencia por cada segmento del tallo. La producción de frutos en las variedades indeterminadas se mantiene durante una temporada prolongada (Hobson y Davies 1980).

1.3.2 Composición química

Los datos de composición química del jitomate varían dependiendo de la especie, etapa de maduración, año y periodo de cosecha, condiciones climáticas, luz, temperatura, suelo, fertilización, riego y otras condiciones de cultivo así como de su manejo y condiciones de almacenamiento poscosecha.

Los frutos de jitomate maduros de buena calidad tienen en promedio de 92.5 a 95% de contenido de humedad. En promedio, el contenido de materia seca en los frutos maduros está entre un 5 y un 7.5%. Los azúcares libres de las variedades comerciales son predominantemente glucosa y fructosa, en cantidades aproximadamente similares, aunque siendo un poco más abundante la segunda; la cantidad de sacarosa es insignificante y raramente excede el 0.1% del peso

seco. En cuanto a los niveles de polisacáridos, son abundantes las pectinas, los arabinogalactanos, los xilanos y los arabinoxilanos. Por su parte, los niveles de almidón (cuya concentración es abundante en el jitomate inmaduro) disminuyen en los frutos maduros(Hobson y Davies 1980).

Los ácidos orgánicos del jitomate han sido objeto de abundante investigación debido no sólo a la importancia en su sabor sino porque su acidez juega un papel preponderante en el procesamiento del fruto a nivel industrial. El ácido predominante en el jitomate maduro es el cítrico, siendo el málico el siguiente en abundancia. Otros ácidos también reportados son el fórmico y el acético, entre otros (Hobson y Davies 1980).

Los reportes sobre la composición de aminoácidos en el jitomate difieren considerablemente. Sin embargo, en el fruto maduro se acepta sin discusión que el aminoácido más abundante es el ácido glutámico, que alcanza el 45% del peso total de los aminoácidos libres en el jugo de jitomate fresco, siendo el ácido aspártico el segundo más abundante. Las diferencias en los reportes de composición de aminoácidos se deben probablemente a la influencia de la variedad analizada.

1.4 Etileno y la maduración del jitomate

El jitomate, al igual que el aguacate, plátano, mango y los demás frutos climatéricos muestran un aumento de la biosíntesis de etileno y un incremento en la respiración durante su maduración. La maduración se puede describir en general como una manifestación coordinada de cambios de color, textura, sabor, aroma y características nutricionales que hacen al fruto más atractivo para sus

consumidores. Durante la maduración del jitomate se modifica su color, que cambia de verde a rojo cuando los cloroplastos se transforman en cromoplastos, como ya se mencionó anteriormente. En este proceso la clorofila se degrada y se acumulan carotenoides como el licopeno. De igual forma, se producen cambios en la textura, dando como resultado el ablandamiento de los frutos (lo que ocurre cuando las paredes celulares se modifican y desensamblan parcialmente por acción de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa etc.). Además, se desarrolla el sabor característico del fruto, debido al incremento de algunos compuestos volátiles y a la alteración del balance azúcar-ácido (Alexander y Grierson, 2002; White, 2002).

El etileno es una molécula gaseosa pequeña que difunde rápidamente en el medio celular. Es una hormona vegetal, con un papel muy importante en la integración de señales del desarrollo y en las respuestas a estímulos externos, bióticos y abióticos. El etileno es un componente crítico de diversos procesos de desarrollo de las plantas, como la germinación de las semillas, la maduración de los frutos, la abscisión y la senescencia (Klee, 2002). También es considerado como una hormona de estrés, ya que las señales adversas bióticas o abióticas estimulan generalmente su síntesis, disminuyendo el crecimiento de la planta hasta que finaliza el estrés. Con respecto a la regulación de la expresión génica, se ha visto que esta fitohormona induce la transcripción de un amplio número de genes involucrados en señales de respuesta a heridas, en la defensa contra patógenos y en la maduración de frutos (Alexander y Grierson, 2002).

En el proceso de maduración del jitomate, un fruto climatérico como ya se comentó, el etileno promueve la expresión de genes que están involucrados en los

cambios de color, textura, sabor, aroma y características nutricionales durante esta etapa de desarrollo.

Como ocurre con diversas señales hormonales, las respuestas al etileno pueden estar moduladas tanto por cambios en los niveles de etileno (biosíntesis y/o degradación) como por los niveles de receptores y/o cambios en su afinidad, y por elementos que participan en las vías de transducción de esta señal (White, 2002).

Se ha propuesto que en frutos climatéricos operan dos sistemas de regulación de la biosíntesis del etileno. El sistema I funciona durante el crecimiento vegetativo normal, siendo el responsable de mantener los niveles basales de etileno detectados en todos los tejidos (incluyendo los de frutos no climatéricos). El segundo sistema opera durante la maduración de frutos climatéricos y la senescencia de pétalos de flores, y en él la producción de etileno es autocatalítica. La maduración usualmente empieza en una región del fruto y se esparce a regiones vecinas conforme el etileno difunde libremente de célula a célula para finalmente alcanzar la maduración de todo el fruto (Alexander y Grierson, 2002).

La vía de síntesis de etileno del sistema I está bien establecida en plantas superiores. El etileno se forma a partir de la metionina. La ruta biosintética se inicia cuando la S-adenosilmetionina (SAM) es convertida al aminoácido cíclico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), a través de la enzima ACC sintasa (ACS) y la posterior oxidación de este intermediario para producir etileno, catalizada por la enzima ACC oxidasa (ACO) (Yang y Hoffman, 1984; Barry y col., 1996).

Los dos genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de etileno, la ACS y la ACO, están fuertemente regulados a nivel transcripcional (Barry y col., 1996; Klee, 2002). Además de la regulación en la biosíntesis de etileno, hay una

regulación de su percepción por diversos tejidos. Por ejemplo, algunos experimentos en jitomate mostraron que frutos que no han adquirido cierto grado de desarrollo no maduran en respuesta a la aplicación de etileno exógeno. En estudios desarrollados con mutantes de jitomate, se ha encontrado una familia de al menos seis receptores de etileno diferentes (*LeETR1*, *LeETR2*, NR, *LeETR4*, *LeETR5* y *LeETR6*) (Wilkinson y col., 1995; Zhou y col., 1996; Tieman y Klee, 1999; Ciardi y Klee, 2001). La expresión de cada receptor está regulada a nivel transcripcional y se expresa de manera diferente, tanto espacial como temporalmente, dependiendo de la etapa de desarrollo, o en respuesta a estímulos externos. Los receptores *LeETR1* y *LeETR2* se expresan constitutivamente en todos los tejidos durante el desarrollo de la planta, NR se expresa principalmente durante la antesis y tanto NR como *LeETR4* tienen una mayor expresión durante la maduración, senescencia, abscisión e infección por patógenos. *LeETR5* se expresa también en frutos y durante la infección por patógenos (Tieman y Klee, 1999).

A medida que la maduración se inicia o progresa, se incrementa la expresión de muchos genes. El análisis de la expresión génica relacionada con la maduración, en mutantes o plantas transgénicas ha indicado la presencia de dos tipos de regulación génica, la dependiente y la independiente de etileno (Oeller y col., 1991). Aunque la regulación génica dependiente de etileno es la dominante en jitomate, se ha sugerido que ambas vías de regulación coexisten en el proceso de maduración en frutos climatéricos y no climatéricos (Lelievre y col., 1997).

1.5 Parámetros de calidad

La calidad se define como el conjunto de cualidades o propiedades que caracterizan a un producto. En el jitomate, la calidad se establece con base en diferentes parámetros, tales como la apariencia física, la textura, el valor nutricional, el sabor (gusto y aroma), los componentes funcionales y la inocuidad.

La calidad del jitomate estándar se ha basado principalmente en la apariencia física, la uniformidad de forma y en la ausencia de defectos de crecimiento. El tamaño no es un factor que defina el grado de calidad, pero es importante en las expectativas de su calidad comercial. Respecto a la forma, el jitomate debe estar bien formado (redondo, globoso, globoso aplanado u ovalado dependiendo del cultivar o variedad). El color debe ser uniforme (anaranjado-rojo a rojo intenso; amarillo claro) sin partes verdes (Suslow y Cantwell, 2006).

Respecto a su textura, un jitomate de buena calidad debe tener una firmeza y succulencia óptimas.

Desde el punto de vista nutricional, como ya se mencionó anteriormente, el jitomate es benéfico para la salud, por lo que en la actualidad se recomienda consumir grandes cantidades del mismo.

El sabor característico del jitomate está conformado por compuestos volátiles constituyentes del aroma y compuestos no volátiles (azúcares, ácidos orgánicos) detectados por el sentido del gusto (Yilmaz, 2001).

Actualmente, uno de los parámetros de calidad de gran importancia es la inocuidad, que se refiere a la necesidad de que los productos hortofrutícolas, como el jitomate, lleguen al consumidor libres de contaminación física, química y

microbiológica, ya que tales contaminantes pueden provocar un daño a la salud del consumidor.

1.6 Sabor y aroma

Muchos consumidores están a menudo insatisfechos con el sabor de algunos frutos frescos que se venden en el supermercado. Para poder conocer la causa es necesario entender qué es el sabor y cómo se percibe.

El sabor es el resultado de la percepción combinada del gusto y el aroma. Los gustos básicos como el dulce, agrio, salado, amargo y umami son percibidos por receptores localizados en ciertas regiones de la lengua. Los nervios en este órgano pueden detectar también la textura y la temperatura, lo que en conjunto se conoce como respuesta trigémina (Baldwin y col., 2000).

Muchos factores pueden afectar la percepción del sabor, especialmente durante la masticación del alimento. Este efecto se debe a la temperatura de la boca, así como a la viscosidad, la polaridad y temperatura del alimento, que pueden afectar a la presión de vapor relativa y a la liberación de sus aromas. Además, la textura puede jugar también un papel clave en la percepción del sabor; así, un jitomate blando puede percibirse con más sabor que un jitomate firme.

Los seres humanos perciben el aroma por el epitelio olfatorio nasal, un área relativamente pequeña de la superficie interna de la cavidad nasal. El sentido del olfato es el más sensible de los cinco sentidos, puede detectar compuestos del olor en concentraciones del orden de partes por trillón, mientras que los receptores en la lengua detectan componentes del sabor en el orden de partes por ciento. La extrema sensibilidad del sentido del olfato ha tenido un papel importante en el

desarrollo evolutivo de los mamíferos, facilitando el reconocimiento a nivel olfativo. Tal sería el caso del reconocimiento de una madre y su cría o el reconocimiento de una presa por un depredador, entre otros ejemplos. Debido a su importancia para la supervivencia de las especies, en mamíferos se han localizado al menos mil genes que codifican para receptores olfatorios (Baldwin y col., 2000).

En la actualidad, se reconoce que aunque se ha avanzado en la cuantificación de la concentración de los compuestos volátiles del aroma, es difícil determinar con precisión cuáles de ellos contribuyen al aroma y en consecuencia al sabor del jitomate. Para tratar de resolver lo anterior, se propuso establecer el llamado umbral de olor, que es la mínima concentración de un compuesto que puede ser detectada por el olfato. En humanos, el umbral para la percepción de moléculas volátiles puede ser tan bajo como $0.07 \mu\text{g/L}$ (Baldwin y col., 2000).

Posteriormente, se obtiene el denominado log de olor, el cual es una relación entre la concentración de un componente en un alimento y su umbral de olor. A partir de este parámetro se ha asumido que los compuestos volátiles del aroma con un log positivo contribuyen de manera impactante al sabor de un alimento, denominándoseles notas altas, mientras que los que presentan valores negativos contribuyen menos o no contribuyen. Los componentes del aroma con logs de olor negativos pueden contribuir al sabor global de un fruto o en general de un alimento como notas de fondo, es decir dando un aroma más sutil y delicado que las notas altas (Baldwin y col., 2000). Asimismo, se encontró que un componente del aroma no necesita estar presente en concentración alta para tener impacto sobre el sabor (Buttery y Ling, 1993; Baldwin y col., 2000).

1.6.1 Componentes del sabor en jitomate

En el jitomate, se ha reportado una mezcla compleja de compuestos volátiles (alrededor de 400) que interactúan con azúcares (glucosa, fructosa y bajos niveles de sacarosa) y ácidos (cítrico y málico) para darle su sabor característico. De los 400 compuestos volátiles identificados se ha encontrado que alrededor de 16 (compuestos del aroma con logs de olor mayores de 0) son los más importantes compuestos de impacto por su contribución al aroma y, por lo tanto, al sabor del fruto. Dichos compuestos son: *cis*-3-hexenal, *cis*-3-hexenol, hexanal, hexanol, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, β -ionona, 2-isobutiltiazol, 1-penten-3-ona, metilsalicilato, *trans*-2-hexenal, linalool, 6-metil-5-hepten-2-ona, metilnitrobutano, geranilacetona y 1-nitro-2-feniletano. Una combinación de estos compuestos en proporciones apropiadas produce el aroma típico del jitomate maduro fresco (Buttery y Ling, 1993; Baldwin y col., 2000; Yilmaz, 2001).

Con el objetivo de determinar qué compuestos volátiles del aroma de jitomate se sintetizan en tejido intacto y cuáles se sintetizan después de la ruptura celular, los frutos son macerados, molidos, u homogeneizados. Inmediatamente después de tales procesos, a los homogenados se les agrega cloruro de calcio (CaCl_2) o EDTA o se calientan en un horno de microondas para inactivar las enzimas. Con tales tratamientos se asume que no sólo se produce la inactivación de las enzimas sino que se disminuyen las reacciones oxidativas no enzimáticas y por ello no se producen nuevos aromas durante la ruptura de las células de jitomate. De esta manera, se ha encontrado que compuestos volátiles como el 3-metilbutanal, 3-metilbutanol y *cis*-3-hexenol entre otros, se sintetizan en el tejido intacto, en

homogenados donde se inactiva a las enzimas involucradas en el metabolismo de los compuestos del aroma. Mientras, el *cis*-3-hexenal, el *trans*-2-hexenal, el hexanal, la geranilacetona y el 2 isobutiltiazol se incrementan después de la ruptura celular (Baldwin y col., 2000). La mayoría de los estudios acerca del perfil químico del aroma de jitomate se han llevado a cabo en fruto macerado u homogeneizado, los estudios con jitomate completo son prácticamente nulos.

La importancia del gusto y del aroma en el sabor del jitomate no está completamente clara. Las interacciones a nivel sensorial son complejas y pueden resultar en la dependencia de sabores con los aromas y viceversa (Lawless y Malone, 1986). Se ha sugerido que los azúcares pueden afectar a la percepción del aroma, mientras que los aromas pueden afectar a la percepción de lo ácido y dulce de un fruto (Baldwin y col., 2004).

Diversos estudios han identificado cuáles son las características del sabor de jitomate que son preferidas por el consumidor. En general se ha mostrado que los jitomates más dulces son los más aceptados (Malundo y col., 1995). Un fruto bien aceptado es aquel que tiene una alta intensidad de aroma a jitomate y es dulce pero con una acidez intermedia. Baldwin y colaboradores (1998) y Causse y colaboradores (2003), relacionan la máxima aceptación del fruto con la relación azúcares/acidez titulable y con la concentración de ciertos aromas.

1.6.2 Técnicas para determinar compuestos volátiles del aroma

1.6.2.1 Análisis del espacio de cabeza en equilibrio dinámico

La técnica del espacio de cabeza dinámico es muy popular para el análisis de compuestos volátiles en alimentos, así como en otros productos. Cuando un gas

inerte es burbujeado a través del líquido, la técnica es conocida como purga y trampa. La muestra debe calentarse para incrementar la fugacidad de los compuestos volátiles. Dichos compuestos son posteriormente atrapados en adsorbentes sólidos o en polímeros con cubiertas líquidas, en una trampa fría o en un solvente. Esta etapa se puede llevar a cabo en un serpentín (loop) abierto o cerrado. En el serpentín abierto las moléculas no atrapadas se eliminan, en el cerrado la fase gaseosa fluye a través de la muestra y la trampa en un circuito cerrado (Grob, 1973; Pillonel y col., 2002).

Después de su adsorción sobre el adsorbente, los compuestos atrapados son desadsorbidos por calentamiento y luego introducidos a una columna del cromatógrafo de gases. Este tipo de desadsorción tiene las siguientes ventajas: 1) se analiza el 100% del contenido de la trampa, 2) no hay pico del solvente, 3) no hay contaminación del solvente (Pillonel y col., 2002).

Por otro lado los analitos pueden también ser eluidos con un solvente con un porcentaje bajo de recuperación. La elución con solventes es difícil de automatizar.

1.6.2.2 Micro extracción en fase sólida

Una técnica disponible recientemente para el aislamiento de los componentes volátiles es la microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés *Solid Phase Micro Extraction*), la cual permite un muestreo rápido. La primera SPME fue desarrollada por Arthur y Pawliszyn en 1990, como una técnica de concentración previa durante el análisis de los contaminantes del agua. En años recientes, esta técnica se ha desarrollado mucho y se ha extendido su aplicación en muy diversos

campos del conocimiento. En la actualidad existen más de 500 publicaciones con trabajos donde se utiliza la SPME; alrededor del 40% de estos trabajos están relacionados con temas ambientales y alrededor del 20% con aplicaciones en temas botánicos y de alimentación.

La técnica SPME puede ser aplicada en el modo de extracción directa o en el de espacio de cabeza. En el primero, la fibra se sumerge directamente en la solución donde se encuentran los analitos que serán extraídos (matriz de la muestra). Para facilitar una rápida extracción de los analitos, que presentan bajos coeficientes de difusión de la matriz hacia la fibra, se requiere una agitación eficiente.

En el modo de espacio de cabeza, los analitos primero tienen que difundir de la matriz hacia el aire y después desde el aire hacia una fibra de sílice recubierta con un polímero. Esta técnica se utiliza para el análisis de compuestos volátiles de matrices complejas (como es el caso de los alimentos) que pudieran dañar la fibra. Las cinéticas de extracción pueden ser mejoradas, ya sea usando una agitación eficiente, elevando la temperatura de la extracción o bien utilizando ambas al mismo tiempo.

Existen seis fibras específicas con diferente tipo de material de cubierta y grosor de la misma que se pueden utilizar para un amplio rango de aplicaciones. Los polímeros de recubrimiento se pueden clasificar en dos grupos: los polímeros de recubrimiento puros como el polidimetilsiloxano (PDMS) y el poliacrilato (PA). Un segundo grupo lo forman las películas hechas de mezclas, que contienen un polímero líquido y partículas sólidas, como el carboxeno-PDMS, el divinibenceno(DVB)-PDMS, el carbowax-DVB y el DVB-carboxeno-PDMS. Las

películas mezcladas combinan las propiedades de absorción del polímero líquido con las propiedades de adsorción de las partículas porosas (Pillonel y col., 2002).

El PDMS puro es fuertemente hidrofóbico, fue diseñado originalmente para la extracción de contaminantes de muestras acuosas. El PA es actualmente el recubrimiento más polar que se conoce para SPME y se utiliza para extraer compuestos muy polares como los ácidos grasos y los compuestos con azufre reducido (Pillonel y col., 2002).

El carboxeno es un compuesto de carbono que funciona como tamiz molecular con poros grandes, medianos y pequeños y que se usa en combinación con PDMS. La combinación anterior es eficiente para mejorar la extracción de moléculas pequeñas.

El divinilbenceno es un polímero sólido que tiene poros más grandes que el carboxeno y es más utilizado en combinación con el PDMS para la extracción de moléculas más grandes como los derivados de anilina.

En la actualidad la nueva combinación de DVB, carboxeno y PDMS ofrece una capacidad de adsorción de moléculas de diversos tamaños más amplia y completa. La fibra presenta una doble capa, la primera capa está hecha de PDMS/carboxeno y se recubre con la capa de PDMS/DVB. Las moléculas pequeñas con un coeficiente de difusión más grande, alcanzan la capa interna con mayor rapidez donde son adsorbidas por el carboxeno. Las moléculas más pesadas son retenidas en la capa externa de DVB. Esta configuración facilita la desadsorción en el cromatógrafo de gases.

Algunas recomendaciones importantes a considerar durante la aplicación de la técnica de SPME son:

-La temperatura en el espacio de cabeza tiene una influencia apreciable en los resultados de la extracción; la temperatura ambiente es favorable para extraer compuestos no polares, mientras que el calentamiento se recomienda para compuestos polares.

-El efecto "salting out" incrementa la cantidad de analitos extraídos, las sales más comúnmente usadas son el cloruro de sodio y el sulfato de sodio.

-En esta técnica se debe tener un espacio de cabeza con un volumen pequeño, en el entendido de que la extracción decrece con el incremento del volumen del espacio de cabeza (Pillonel y col., 2002).

-La agitación de las muestras líquidas puede ser útil para el muestreo del espacio de cabeza. El tiempo para alcanzar el equilibrio se reduce mucho con la agitación durante el muestreo de compuestos menos volátiles; sin embargo, la agitación tiene un mínimo efecto para la extracción de compuestos altamente volátiles.

La principal limitación de la SPME es la cantidad relativamente pequeña de adsorbente disponible en la fibra, lo cual provoca que se sature y no atrape todos los analitos del espacio de cabeza, para lo cual se han ideado fibras con camas enriquecidas con PDMS. Posteriormente, la fibra se transfiere al puerto de inyección de un cromatógrafo de gases, donde los compuestos volátiles son desorbidos a altas temperaturas. En la actualidad hay cromatógrafos de gases acoplados a detectores de masas que identifican, mediante una biblioteca de masas y cuantifican los compuestos químicos que se encuentran en los aromas (Pillonel y col., 2002).

1.6.3 Análisis sensorial del jitomate y su correlación con la calidad

La evaluación sensorial involucra la medición, cuantificación e interpretación de las características sensoriales de los alimentos, a través del uso de seres humanos que actúan como jueces. La evaluación sensorial puede ser empleada para diversos productos alimenticios, entre los que se pueden mencionar las frutas y los vegetales. En estos productos se evalúan diferentes parámetros de calidad, como la apariencia física, el sabor (aroma y gusto) y la textura de un producto en particular (Heintz y Kader, 1983; Ibáñez y Barcina, 2001).

La evaluación sensorial es el complemento de una larga serie de análisis fisicoquímicos que se realizan a un producto específico para la determinación completa de su calidad. Así, mientras las pruebas fisicoquímicas proporcionan información específica acerca de la composición y la naturaleza física del producto, la evaluación sensorial nos permite analizar diversos parámetros de manera integral. De esta manera, los resultados de diferentes pruebas sensoriales y químicas pueden correlacionarse para identificar la relación entre las propiedades químicas de un producto y sus cualidades sensoriales. La evaluación sensorial nos permite, además, determinar el impacto de diferentes variables (por ejemplo la temperatura) sobre la calidad sensorial del producto (Heintz y Kader, 1983; Piggott y col., 1998).

1.6.3.1 Métodos sensoriales

Los métodos sensoriales pueden ser separados en dos grupos: métodos discriminativos y métodos descriptivos. El propósito de la discriminación es indicar únicamente si los productos que están siendo evaluados se perciben como

diferentes. Mientras que los métodos descriptivos son más similares a los análisis químicos, por ejemplo al determinar la presencia o la intensidad de una característica particular (Piggott y col., 1998).

1.6.3.1.1 Pruebas o métodos discriminativos

Como ya se mencionó, los ensayos discriminantes son aquellos que tienen por objeto establecer si entre dos o más muestras existe o no diferencia en alguna característica, o teniéndolas en cuenta todas conjuntamente. Dentro de este tipo de pruebas existe gran variedad de métodos específicos, algunos de ellos bien conocidos, como la prueba triangular o la de la comparación pareada, y otros menos conocidos. Sin embargo, todos estos métodos pretenden contestar a una pregunta semejante: ¿son estos dos productos percibidos como diferentes?.

Entre las pruebas de discriminación se incluyen A-no-A (ISO 8588:1987), Comparaciones Pareadas (ISO 5495:1983), Dúo-Trío (ISO 10399:1991) y Pruebas Triangulares (ISO 4120:1983) (Ibáñez y Barcina, 2001).

La prueba de Comparación Pareada es un ensayo con dos productos en el que el sujeto debe indicar el producto que presenta una característica (olor, sabor, etc.), que se identifica y señala previamente, con un grado de intensidad (prueba direccional), o señalar si son iguales o diferentes (no direccional). En forma habitual, la instrucción que se le da al sujeto le obliga a tomar una decisión, esto es, ha de elegir uno de los productos.

La prueba A-no-A se puede considerar como una variante de la comparación pareada. Este procedimiento es de interés en aquellos casos en los que algunos atributos, por ejemplo el color, pueden influir en los resultados. El principio es la

presentación al sujeto de una serie de muestras, parte de las mismas está constituida por la muestra A mientras que otra parte es diferente de la muestra A. Para cada muestra, el sujeto debe determinar si es o no idéntica a A. Esta prueba implica que se conoce la muestra A.

La Prueba Triangular, como su nombre lo indica, es una prueba con tres productos en el que todos están codificados y el sujeto debe indicar que dos productos son similares entre sí y cuál es el más diferente. Se utiliza mucho, porque se creía erróneamente que era la más sensible de las pruebas discriminativas. La prueba se aplica cuando existe una diferencia débil entre muestras de productos. Estas diferencias se pueden determinar sobre el conjunto de propiedades o sobre una sola propiedad de la muestra. El principio de esta prueba se basa en la presentación simultánea a los sujetos de una serie de 3 muestras de las que 2 son idénticas.

La prueba Dúo-Trío es una alternativa a la prueba triangular. El ensayo se destina a establecer si existe diferencia entre dos productos, bien considerando una característica o bien tomando conjuntamente todas las propiedades sensoriales del producto, con relación a una referencia. La prueba se puede desarrollar mediante dos métodos, el de la referencia alternativa y el de la referencia constante (Ibáñez y Barcina, 2001).

1.6.3.1.2 Pruebas descriptivas

Generalmente, un producto alimentario se caracteriza por varios parámetros físicos y químicos. Algunos de ellos son monodimensionales (por ejemplo, la longitud, el peso, etc.) y otros son multidimensionales (por ejemplo, el aroma, la

textura, el color, el sabor, etc.). Estas últimas magnitudes, complejas, son la combinación de diferentes magnitudes simples. Sin embargo, a menudo, la descomposición en magnitudes simples no es suficiente y se utilizan además parámetros descriptivos que evalúan el conjunto: impresión global, sabor característico, etc.

La evaluación de una magnitud sensorial compleja necesita la ejecución de una metodología basada en la investigación y la cuantificación de unos términos descriptores apropiados. Esta metodología constituye lo que se denomina el análisis sensorial descriptivo, también llamado perfil sensorial. La elaboración del perfil sensorial de un producto es bastante compleja y el usuario de este método debe ser consciente de que puede dar buenos resultados, pero se necesita una investigación importante en tiempo de preparación, cálculos y número de sesiones (Ibáñez y Barcina, 2001).

La evaluación sensorial basada en pruebas descriptivas requiere de un panel sensorial bien entrenado, que opere como cualquier otro instrumento analítico de laboratorio. Dicho panel suministra datos sobre la intensidad o el nivel de una serie de atributos sensoriales de los productos. Tales atributos son escogidos porque pueden variar durante un tratamiento (almacenamiento en refrigeración, por ejemplo) y porque pueden afectar la aceptación del consumidor. Se denominan descriptores y contribuyen, como su nombre lo indica, a describir la impresión global del producto, por lo que deben ser precisos, discriminantes, exhaustivos e independientes. Su número puede ir desde 5 hasta 15 y en ciertos casos aun más (Stone y Siedel, 2004).

En su origen, el perfil sensorial fue un test descriptivo cualitativo denominado perfil de flavor (por sus siglas en inglés de *Flavor profile*) donde flavor es la percepción del aroma tanto en la boca como en la nariz, juntas) (Ibáñez y Barcina, 2001). Esta técnica fue desarrollada a finales de los años 40 y principio de los 50 del siglo XX en los Estados Unidos por A. D. Little y sus colaboradores. Inicialmente fue utilizada para describir el efecto del monoglutamato de sodio en la percepción del sabor. Durante todos estos años ha sido continuamente mejorada. La última versión incluye escalas numéricas lo que permite tratar estadísticamente los resultados y se le conoce como análisis de los atributos del perfil (*Profile Attribute Analysis* o PAA).

En los años 70 del siglo pasado se desarrolló lo que se denomina el Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA, por sus siglas en inglés de *Quantitative Descriptive Analysis*) para corregir algunos de los problemas asociados con el perfil de flavor. En este método se utilizan escalas no estructuradas para describir la intensidad de los atributos. Se elige una escala gráfica lineal con una línea que se extiende más allá de los puntos verbales que marcan los extremos, ya que parece ser que esta escala puede reducir la tendencia del panelista para utilizar la parte central de la escala evitando el uso de puntuaciones muy altas o muy bajas (Stone y Siedel, 2004).

Para aplicar los métodos descriptivos de elaboración de perfiles es necesario un conocimiento básico del análisis multidimensional, en particular del análisis de componentes principales.

La finalidad del análisis descriptivo es describir, con un número mínimo de palabras y un máximo de eficacia, el producto a analizar, de manera que tenga

una carta de identidad precisa reproducible y comprensible para todos. El análisis descriptivo debería ser el primero para la medida sensorial de un producto.

Las diferentes etapas seguidas en el desarrollo del análisis descriptivo son:

a) Formación del panel de jueces

El número mínimo de sujetos necesario, con el fin de tener en cuenta las diferencias interindividuales, es de 6. Sin embargo se debe entrenar un número doble o triple de individuos para disponer de modo permanente de un grupo de 6 a 10 sujetos. De la calidad del panel depende la calidad del perfil sensorial. Es importante formar y entrenar correctamente a los sujetos antes de seleccionarlos, en función de su aptitud para reconocer y evaluar el tipo de producto sobre el que se investiga.

Para la selección de los sujetos, los primeros criterios que se han de tener en cuenta son su aptitud para la creatividad y capacidad de expresión verbal. El entrenamiento se efectúa con el tipo de producto con el que se elaborará el perfil.

b) Elaboración de una lista de términos descriptivos

En la primera búsqueda de descriptores se pretende generar el mayor número posible de vocablos. Esta fase, realizada de modo individual, tiene por finalidad no olvidar ningún aspecto del producto y evitar los errores debidos a la influencia del individuo sobre el grupo. A continuación, los sujetos trabajarán en grupo y confrontarán sus apreciaciones bajo la dirección del coordinador de la prueba, quien les incitará a analizar cada uno de los elementos de la percepción del producto. Estos elementos deberán traducirse en un descriptor apropiado. En

general, el grupo llegará a generar, tras varias sesiones, más de un centenar de términos descriptivos. Todos los términos descriptivos se recogerán en esta etapa, incluyendo los sinónimos.

c) Reducción preliminar de los descriptores

El coordinador explicará a los sujetos la razón por la cual los términos hedónicos, cuantitativos, los que describan al producto por si mismo y los términos no pertinentes, se estiman inadecuados para el fin de la búsqueda, que es identificar y describir la naturaleza de las percepciones, a fin de delimitar el conjunto de diferencias entre productos. Con la eliminación de estos términos se busca la reducción de los descriptores. En posteriores sesiones y con el fin de reducir aun más el número de descriptores se eliminarán los términos que parezcan mal adaptados para describir o diferenciar los productos desde el punto de vista sensorial.

d) Elección de los productos o sustancias de referencia

Cuando el número de descriptores se ha reducido se requiere dar una definición a cada descriptor, comprensible para todos los jueces y que se conservará como referencia.

e) Entrenamiento

Para hacer un buen entrenamiento del panel, se debe mantener la referencia del descriptor, de tal manera que posea una concentración correspondiente a la posición media de la escala de intensidad (Fig. 1).

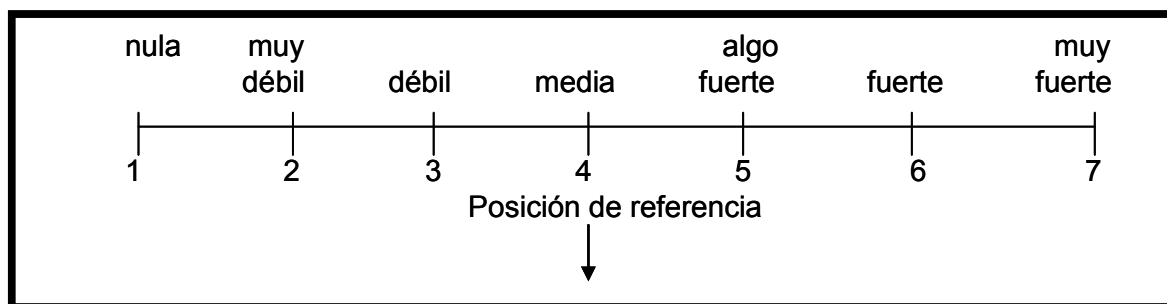


Fig. 1 Escala de intensidad para los descriptores, con la posición de la referencia

1.6.4 Biosíntesis de compuestos volátiles en jitomate

1.6.4.1 Rutas metabólicas de síntesis

La biogénesis de los compuestos del aroma de jitomate se ha sometido a diversas revisiones. Como previamente se mencionó, los compuestos volátiles del aroma de jitomate se sintetizan durante la maduración del fruto o durante la ruptura de tejidos (lo que ocurre cuando el fruto es masticado, macerado, molido u homogeneizado) (Baldwin y col., 1991). Cuando ocurre la ruptura de tejidos, las enzimas y sustratos que previamente estaban en diferentes compartimientos entran en contacto, sintetizándose nuevos compuestos volátiles (Buttery y Ling, 1993).

Los compuestos volátiles del jitomate se producen por diferentes vías. Por ejemplo, el hexanal, hexenal, hexanol y hexenol, que son responsables de las notas verdes y frescas en frutos maduros, se forman por la lipooxidación de ácidos grasos insaturados durante la maceración o masticación del fruto (Baldwin y col., 2000). En esta ruta participan las enzimas lipooxigenasa (LOX), hidroxiperóxido liasa (HPL) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta vía comienza con la formación de los hidroperóxidos 9,13 por la enzima LOX, que utiliza como sustrato ácidos

grasos como el cis1,4 pentadieno, producidos a partir de los lípidos del jitomate. Los hidroperóxidos, a su vez, sirven como sustrato para la enzima HPL, que produce algunos aldehídos y aldoácidos de 6 y 9 átomos de carbono. Los productos iniciales de la enzima HPL son convertidos por isomerización alílica a los isómeros trans, como el trans-2-hexenal, o se reducen por la enzima ADH para convertirse en alcoholes, como el hexanol, cis-3-hexenol y otros (Fig. 2), (Sanz y col., 1997).

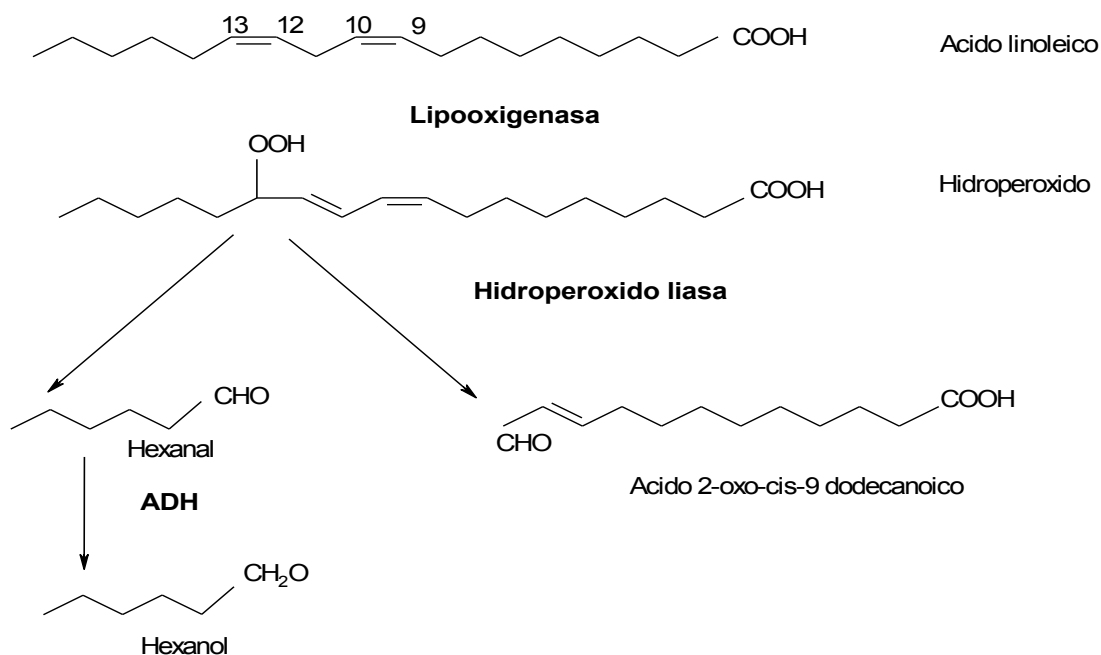


Fig. 2 Síntesis de hexanal y hexanol a partir de ácido linoleico

El 3-metilbutanal y 3-metilbutanol se forman por la vía de desaminación y descarboxilación de aminoácidos, específicamente de la leucina. En estudios de esta vía con ¹⁴C-leucina se observó que en una primera etapa, la leucina presenta una transaminación catalizada por la enzima leucina 2-cetoglutarato

aminotransferasa, obteniéndose glutamato y un 2-cetoácido. El 2-cetoácido formado es descarboxilado para producir el 3-metilbutanal. Esta descarboxilación es catalizada por un complejo enzimático similar al de la piruvato deshidrogenasa, que utiliza como cofactor el pirofosfato de tiamina. El 3-metilbutanal es reducido al alcohol (3-metilbutanol) por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), utilizando NADH como cofactor. Este último paso de la vía metabólica se lleva a cabo muy rápidamente, ya que no se ha detectado la presencia de aldehído marcado (Fig. 3) (Sanz y col., 1997).

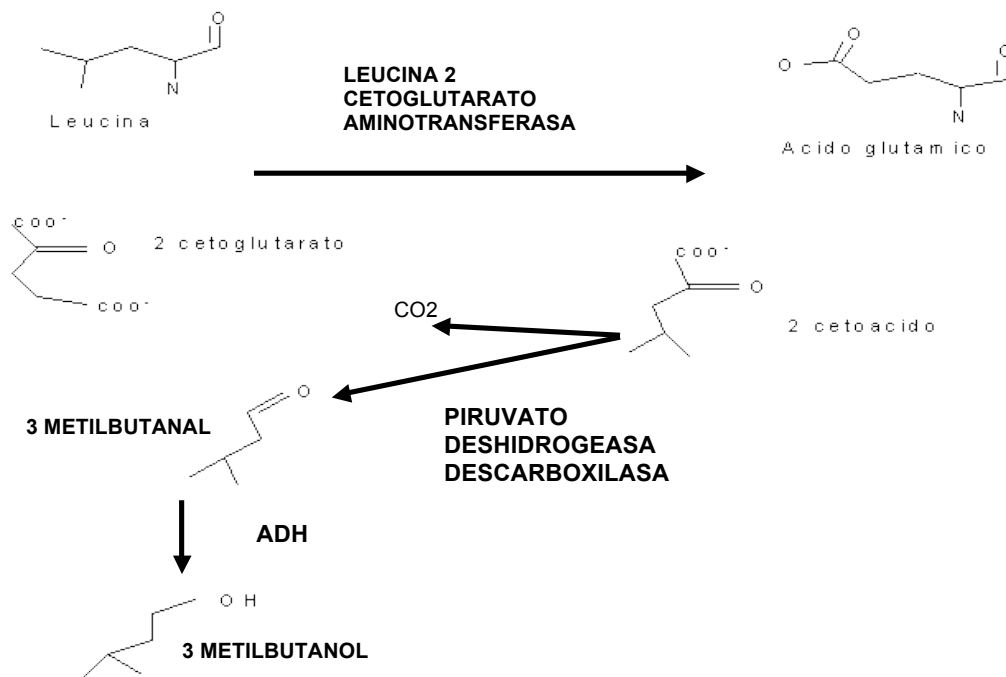


Fig. 3 Síntesis de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol a partir de leucina

Otros volátiles del aroma de jitomate se sintetizan a partir de diversos aminoácidos, como la alanina, valina, isoleucina y fenilalanina (Baldwin y col., 2000). Se ha sugerido que la metionina está involucrada en la biosíntesis del 2-isobutiltiazol en jitomate. Además, se ha propuesto la hipótesis de que este importante compuesto del jitomate es sintetizado por la reacción de la cisteamina con el 3 metilbutanal proveniente de la leucina (Sanz y col., 1997).

El eugenol, el alcohol fenético y el guayacol se sintetizan a partir del aminoácido fenilalanina, a través de la vía del ácido siquímico y el metabolismo de fenilpropanoides (del que proceden varios compuestos fenólicos). Sin embargo, sólo aquellos compuestos con pesos moleculares relativamente pequeños, con una solubilidad apreciable en lípidos y alguna solubilidad en agua son importantes en términos del aroma.

El ácido cinámico y su éster activado cinamoilCoA o su forma conjugada (derivado o-glucosílico), son los intermediarios claves del metabolismo de fenilpropanoides y, por ello, son precursores de una gran variedad de compuestos fenólicos con cambios bioquímicos a nivel de su cadena lateral. Los compuestos que se obtienen de esta manera contribuyen también al aroma del jitomate. Las notas aromáticas dadas por los compuestos fenólicos van desde olor a especias, medicinal o fenólico y olor a humo hasta notas más agradables como las impartidas por la vainillina.

La β -ionona y la geranilacetona son probablemente producidas por degradación de terpenoides más largos, como el β -caroteno y el licopeno, respectivamente.

Los monoterpenos, como el linalool, se forman directamente a partir del geranil difosfato (GPP) a través de la vía isoprenoide. El linalool es uno de los diez compuestos volátiles más importantes del aroma de jitomate, impartiendo una nota dulce y floral. La enzima que sintetiza el S-linalool a partir del GPP es la linalool sintasa (LIS) (Fig. 4).

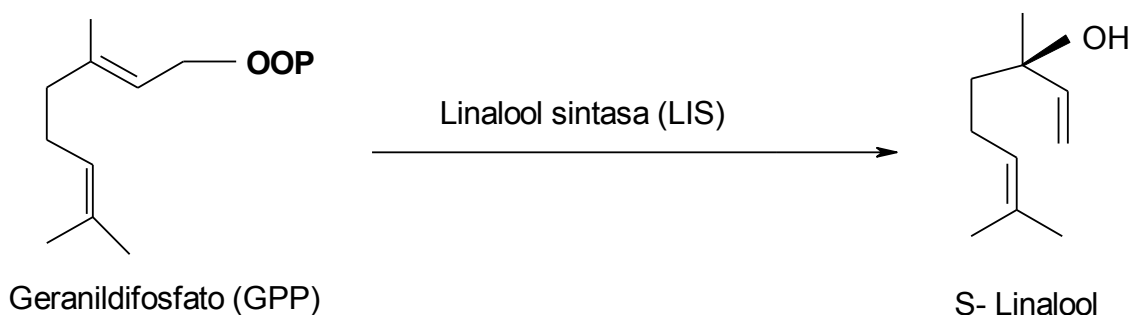


Fig. 4 Síntesis de S-linalool a partir del GPP

1.6.4.2 Enzimas clave en la biosíntesis de compuestos del aroma en jitomate

Aunque muchos compuestos del aroma de jitomate han sido identificados, las enzimas y los genes que controlan su producción y su patrón de herencia se han estudiado muy poco. Los lentos avances en el estudio de las diversas vías metabólicas de la generación de aromas han permitido identificar algunas de las enzimas clave, entre ellas la enzima alcohol deshidrogenasa ADH, la linalool sintasa (LIS) y la lipoxigenasa, entre otras. Estas enzimas han sido estudiadas y algunas de ellas modificadas genéticamente para mejorar el sabor de jitomate (Speirs y col., 1998; Prestage y col., 1999).

La enzima ADH (alcohol NAD oxidoreductasa, E.C. 1.1.1.1.) de jitomate es una enzima oxido reductasa poco específica, que es capaz de usar como sustratos

alcoholes primarios y aldehídos, participando en su interconversión (Sieso y col., 1976). La enzima es importante en la vía de biosíntesis de los compuestos volátiles de impacto: trans-2-hexenal, hexanal, 3-metilbutanol y hexanol, que contribuyen a las notas herbáceas y frescas de su aroma.

En jitomate existen 2 genes ADH, uno de ellos el *adh1* que se localiza en el cromosoma 4 y se expresa durante el desarrollo de la semilla, en el polen y en plántulas (Tanksley, 1979). Por su parte, el gen *adh2* (localizado en el cromosoma 6) se expresa en diversos tejidos en respuesta a estrés de tipo anaeróbico (bajos niveles de oxígeno) y por un periodo corto durante la embriogénesis (Chen y Chase, 1993). También se ha encontrado enzima ADH2 activa en el pericarpio de jitomate maduro, siendo igualmente el resultado de la expresión del gen *adh2* (Bicsak y col., 1982). El análisis por Southern blot del ADN genómico de jitomate mostró múltiples secuencias relacionadas con *adh2*. Se presume que dos de estas secuencias, concretamente las denominadas *PSA1* y *PSA2* son pseudogenes (Longhurst y col., 1994).

La ADH2 del fruto es un dímero de peso molecular de 90 a 100 kDa, que utiliza como coenzima al NAD⁺. Estudios de absorción atómica indican la presencia de 15 a 48 átomos de zinc en su estructura. Bicsak y colaboradores (1982) encontraron que los mejores sustratos para esta enzima son el etanol y el acetaldehído. Un estudio reciente demostró el efecto de la manipulación genética de los niveles de ADH en frutos de jitomate maduros. Las plantas de jitomate transformadas con el ADNc correspondiente al gen *adh2*, presentaron frutos algunos con mayores y otros con menores niveles de actividad de ADH. Los frutos con mayor actividad de esta enzima tenían también mayores niveles de hexanol y

cis-3-hexenol, mientras que en los frutos con menor actividad de ADH los niveles de estos compuestos volátiles eran menores. Asimismo, la concentración de sus respectivos aldehídos generalmente no se alteraba. Los frutos que tenían niveles incrementados de estos alcoholes también tenían mayor sabor a fruta madura, según un panel sensorial (Speirs y col., 1998).

Otra enzima clave en la generación de aromas es la linalool sintasa. Es una enzima monomérica, con un peso molecular de 76 KDa, soluble y que tiene una Km de 0.9 μ M para el geranilpírofosfato. Exhibe un fuerte requerimiento de Mn^{2+} y muestra un pH óptimo de 7.4. La sobreexpresión de esta enzima durante la maduración de jitomate transgénico dirige una parte de la cantidad de isoprenoides presentes en los cloroplastos hacia S-linalool, incrementando la concentración de este último en el fruto maduro, lo cual mejora su aroma (Lewinsohn y col., 2001). De igual forma, se localiza en flores, donde está regulada durante el desarrollo, y en los distintos órganos florales (Dudareva y col., 1996).

1.7 Almacenamiento de jitomate

Por su composición química, física y sus características fisiológicas, los productos agrícolas frescos pierden fácilmente su calidad si se mantienen en condiciones ambientales normales. El almacenamiento en refrigeración con una humedad relativa apropiada disminuye el metabolismo y permite preservar durante más tiempo la calidad comercial de los productos altamente perecederos.

Se ha reportado que el jitomate tiene diferentes temperaturas óptimas de almacenamiento, dependiendo de su estado de madurez, para conservar durante

más tiempo sus características de textura y color. El jitomate de color verde maduro tiene una temperatura óptima de almacenamiento de entre 12.5-15 °C (Maul y col., 2000; Suslow y Cantwell, 2006). Si se almacenan este tipo de frutos durante 14 días antes de madurarlos, no muestran una reducción significativa de su calidad sensorial y desarrollo de color después de la maduración. La pudrición se presenta si se les almacena más de dos semanas a esta temperatura (Suslow y Cantwell, 2006). Los frutos de color rojo claro se deben almacenar preferentemente entre 10-12.5 °C. Por su parte, para el jitomate maduro firme se recomienda una temperatura de entre 7-10 °C, rango en el que su vida de anaquel puede alcanzar de 8 a 10 días (Suslow y Cantwell, 2006).

En ocasiones, durante la distribución comercial se aplican temperaturas de tránsito o de almacenamiento, de corto plazo, inferiores a las recomendadas. Esto puede causar, después de algunos días, una fisiopatía denominada daño por frío (DPF) (Suslow y Cantwell, 2006). Los síntomas del DPF en jitomate incluyen una maduración desigual o parcial, un incremento en la susceptibilidad poscosecha del fruto al ataque de hongos, un picado superficial y una reducción en el aroma (Maul y col., 2000).

La gravedad del DPF depende de la temperatura de almacenamiento, del periodo de exposición de las frutas a esa temperatura y de la etapa de maduración de la fruta. Una humedad relativa óptima (entre 90-95%) es esencial para maximizar la calidad poscosecha y prevenir la pérdida de agua. Sin embargo, periodos prolongados con humedades relativas en ese rango pueden aumentar la pudrición del fruto.

Se ha demostrado que se puede extender la vida de almacenamiento del jitomate con la aplicación de atmósferas controladas. Bajas concentraciones de O₂ (3-5%) retrasan la maduración y el desarrollo de pudrición en la superficie sin afectar severamente la calidad sensorial, según estudios con consumidores. Usando una combinación de 4% O₂, 2% CO₂ y 5% CO se ha reportado un periodo de conservación de hasta siete semanas. Sin embargo, este beneficio se sigue considerando moderado (Suslow y Cantwell, 2006).

1.8 Factores que afectan la generación del aroma en jitomate

Existen algunos reportes que demuestran que las condiciones climáticas y culturales afectan el sabor del jitomate: por ejemplo, las lluvias fuertes o la fertilización con nitrógeno y potasio pueden disminuir o aumentar, respectivamente, los componentes del aroma. El daño físico de los frutos durante la cosecha y el manejo poscosecha alteran también los perfiles de aromas (Baldwin y col., 2000; Moretti y col., 2002).

En el transcurso de los últimos veinte años ha habido numerosos reportes en los que los consumidores manifiestan una creciente insatisfacción por el jitomate fresco vendido en los supermercados. Los investigadores han propuesto diversas razones para explicar este hecho, entre ellas que los productores han favorecido tradicionalmente la selección del jitomate con base en su resistencia a enfermedades, productividad y firmeza y no en cuanto a características de sabor y aroma del fruto (Ruíz y col., 2005). Asimismo, se le ha dado poca importancia a la influencia del estado de madurez, las prácticas de manejo comercial y las

temperaturas de almacenamiento sobre la calidad del sabor del jitomate durante su maduración (Kader y col., 1978; Maul y col., 1998).

1.8.1 Etileno y producción de aromas

El papel del etileno en el inicio de la maduración de frutos y hortalizas, y en particular del jitomate, está bien establecido. Sus mecanismos de acción, particularmente en relación con la producción de aromas, no se comprenden sin embargo en su totalidad. Para determinar el papel de esta hormona en el desarrollo del aroma y del sabor en otros frutos (manzana), se han usado plantas transgénicas, que muestran actividad reducida de ACC sintasa y ACC oxidasa (y por ello bajos niveles de etileno). También se ha utilizado el 1-metilciclopropano, el cual es un inhibidor de la acción del etileno. Con estas dos estrategias se ha observado que los componentes del aroma se regulan en forma diferente por la supresión de su biosíntesis o por la supresión de la acción del etileno. De esta forma, se encontró que un evento asociado con la disminución de etileno es la reducción en la producción de ésteres y alcoholes del aroma de manzana, algo que no ocurre lo mismo con los niveles de aldehídos. Otros metabolitos del sabor que mostraron ser dependientes del etileno fueron los ácidos orgánicos y los azúcares (Defilippi y col., 2004). En otro estudio con manzana, se encontró también que una disminución de los niveles de etileno provoca una reducción significativa en las concentraciones de los ésteres (Dandekar y col., 2004).

En estos estudios se comprobó que varias enzimas involucradas en la síntesis de los componentes volátiles del aroma están reguladas por etileno. En jitomate se ha encontrado que la enzima lipooxigenasa (LOX) es regulada a nivel

postranscripcional por etileno durante el climaterio (Kausch y Handa, 1997). Otra enzima inducible por etileno es la alcohol deshidrogenasa ADH2 (Flores y col., 2002), enzima con un papel importante en la síntesis de hexanol y hexenol (Speirs y col., 1998).

1.8.2 Cambios en los compuestos volátiles del aroma durante el almacenamiento de jitomate

En estudios realizados con jitomates macerados o cortados se encontró que cuando los frutos se almacenan a 16 °C cambia su sabor, probablemente porque se modifican los compuestos volátiles característicos de su aroma (Kader y col., 1978). Se ha observado una reducción en los niveles de los compuestos volátiles importantes cuando el jitomate se almacena a 2, 5, 10, 12.5 y 13 °C (Buttery y col., 1987; Stern y col., 1994; Maul y col., 2000). El mecanismo por el cual los niveles de los compuestos volátiles se reducen es desconocido, pero pudiera estar relacionado con la disminución de la síntesis de etileno a bajas temperaturas. Asimismo, cuando los jitomates almacenados a 2, 5, 10 ó 12.5 °C fueron analizados por un panel entrenado de jueces mostraron un sabor y aroma de jitomates menos maduros y una disminución en la intensidad de su sabor. Sin embargo, se necesitan más estudios para entender realmente el efecto de la baja temperatura sobre el aroma del jitomate, atributo de calidad que se ve afectado más rápidamente que la apariencia física (Kader 2008).

1.9 Efecto de la refrigeración en las rutas de biosíntesis de aromas (o en sus enzimas) en plantas.

Los reportes del efecto de la baja temperatura en los compuestos volátiles del aroma de jitomate fresco son escasos y en los que existen no han tratado de dar una explicación a los cambios que se presentan, evaluando por ejemplo si estos cambios son debidos a que las enzimas que participan en la síntesis de dichos compuestos son afectadas por la baja temperatura. Maul y colaboradores en el año 2000, reportaron que el almacenamiento del jitomate fresco a baja temperatura afectó los niveles de algunos volátiles, y que la magnitud del cambio depende de la variedad, de la temperatura de almacenamiento y del tiempo de exposición. Reportaron una reducción considerable en la concentración de volátiles derivados de lípidos (hexanal, cis-3-hexenal, 1-penten-3-ona, trans-2-hexenal y cis-3-hexenol) en las variedades BHN-189 y Solimar. En el jitomate BHN-189 el porcentaje de disminución de estos volátiles es mayor (50%) que el que se observa en la variedad Solimar (36%). También reportaron una disminución del nivel de los volátiles derivados de aminoácidos como el 1-nitro-2-feniletano, 2+3-metilbutanol así como una reducción en los niveles de los volátiles derivados de carotenos y de terpenos (2-isobutiltiazol, 6-metil-5-heptanona, geranilacetona y β -ionona). Los cambios en estos volátiles disminuyeron la intensidad de ciertos descriptores (maduro, dulzura, jitomate) del aroma de jitomate. La disminución significativa de la generación de volátiles en general y en particular la reducción en los niveles de cis-3-hexenal en el jitomate almacenado en una temperatura inferior a 10 °C también fueron reportados por Stern y colaboradores en 1994.

Existen otros reportes donde se han hecho experimentos en plantas de jitomate transformadas en los que se manipuló la expresión y en consecuencia los niveles de actividad de las enzimas ADH y desaturasa Δ -9 que participan en las rutas de biosíntesis de aromas a partir de lípidos y aminoácidos, observándose que los niveles de algunos compuestos volátiles producidos a partir de dichas vías se alteran, lo cual modifica el aroma de los frutos (Wang y col., 1996; Speirs y col., 1998).

En otras plantas los reportes sobre el efecto de la baja temperatura en las rutas de biosíntesis de los compuestos volátiles de sus aromas tampoco son abundantes. Ayala-Zavala y colaboradores (2004) reportaron que en fresa la vida poscosecha basada en la calidad global de los frutos dependió de la temperatura de almacenamiento, siendo más larga a 0 °C y menor a 5 °C y 10 °C. La producción de compuestos volátiles del aroma fue influenciada fuertemente por el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Los niveles de los compuestos volátiles individuales como el etil hexanoato, hexil acetato, metil acetato y butil acetato se incrementaron, mientras que los de 3-hexenil acetato y metil hexanoato disminuyeron durante el almacenamiento. En general, las fresas almacenadas a 10 °C o 5 °C produjeron mayores niveles de estos volátiles que las que fueron almacenadas a 0 °C

En manzana 'Gala' se encontró que la actividad de la enzima alcohol aciltransferasa (ATT) disminuyó a los 4 meses de almacenamiento refrigerado en aire, lo cual modificó el perfil de compuestos volátiles de la manzana (Fellman y

col., 2000). La enzima ATT lleva a cabo la formación de esteres volátiles mediante la condensación de un alcohol con un ácido carboxílico.

Luaces y colaboradores (2005), reportaron que la actividad de la enzima lipooxigenasa (LOX) se redujo drásticamente en los frutos de oliva almacenados a 5 °C, mientras que permaneció constante en los frutos almacenados a 20 °C, por su parte la actividad de la enzima hidroxiperóxido liasa no cambió en los frutos almacenados a 5 °C, pero disminuyó en los almacenados a 20 °C. El cambio en el perfil químico de los compuestos volátiles del aceite de oliva extraído de los frutos almacenados a 5 °C y 20 °C estuvo relacionado con las actividades de estas dos enzimas.

1.10 Avances en el mejoramiento genético de la calidad sensorial del jitomate

En vista de su gran importancia económica y fácil manejo en el laboratorio, el jitomate ha sido objeto de un intenso estudio a nivel molecular en las últimas décadas, principalmente con el objetivo de conservar algunos de sus parámetros de calidad (Hobson y Grierson, 1993).

Muchos componentes de las vías bioquímicas que participan en los cambios de pigmentación, pared celular, metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de etileno y transducción de señales han sido identificados mediante la alteración de su expresión en plantas transgénicas. Por otro lado, el uso de bibliotecas de ADNc ha resultado una herramienta útil para identificar genes que son regulados en forma diferencial durante la maduración de jitomate y otras frutas (Alexander y Grierson, 2002).

Los genetistas no han encontrado cómo satisfacer los altos estándares de calidad de sabor que exigen los consumidores. Hasta ahora se han concentrado en cómo mejorar los niveles de azúcares y ácidos orgánicos de los frutos y han dado poca atención a las características del aroma y sabor del jitomate debidas a compuestos volátiles. Estos investigadores necesitan criterios de selección más eficientes y una perspectiva más amplia de cuáles son las características del sabor que es factible mejorar. Para ello se requiere conocer la variabilidad genética disponible, el modo en el que las características sensoriales se heredan y la influencia que tienen en ellas las condiciones de crecimiento y del medio ambiente. Aún así, se han logrado algunos avances a nivel genético. Causse y colaboradores (2001) utilizaron cruza genéticas gruesas para identificar mediante QTLs, (por sus siglas en inglés de *Quantitative Trait Loci*) líneas con diferentes propiedades sensoriales de jitomate. Las líneas identificadas que tuvieron buena aceptación por los consumidores pueden ser ahora caracterizadas con respecto a sus compuestos volátiles y no volátiles (Carrari y Fernie, 2006). Sin embargo, se debe considerar (según se destaca en algunos reportes) que no todos los compuestos volátiles pueden mejorar la calidad del aroma de jitomate, ya que por ejemplo se ha identificado un alelo de mal olor que afecta al aroma en especies silvestres de jitomate y que fue seleccionado durante la domesticación del jitomate (Tadmor y col., 2002).

Se requieren más estudios para entender realmente el efecto del medio ambiente, de las condiciones de cultivo y del manejo poscosecha sobre el sabor de jitomate. Sin embargo, hasta el momento, la baja calidad sensorial del jitomate parece ser el resultado de prácticas de selección erróneas que no han considerado el sabor

debido a carencia de información (Ruíz y col., 2005). Para iniciar el mejoramiento de la calidad de sabor del jitomate se puede empezar por corregir el estado de madurez de cosecha, las prácticas de manejo y el abuso de temperaturas de almacenamiento inferiores a 16 °C. Aún así, falta información sobre el sabor para que los genetistas y los biólogos moleculares logren frutos cada vez con mejor calidad sensorial. Para ello se deben alcanzar mayores avances en la identificación de los componentes del sabor más importantes del jitomate y en la determinación de sus concentraciones en el fruto fresco. Asimismo, se debe tener más información acerca de los rangos de concentración óptimos y las proporciones de azúcares, ácidos y compuestos del aroma que se requieren para un buen sabor. Finalmente, se requieren futuras investigaciones para evaluar si los métodos sensoriales o los instrumentales (químicos) son los más efectivos para analizar los componentes más importantes del sabor. El establecer la relación entre las determinaciones sensoriales e instrumentales permitirá evaluar los efectos de la selección, la transformación genética, la madurez de cosecha y el manejo poscosecha del jitomate sobre su calidad sensorial.

2 JUSTIFICACIÓN

La calidad integral de un fruto maduro como el jitomate está definida por diversos atributos, entre los que se pueden mencionar la textura, la apariencia, el sabor o percepción conjunta del gusto y el aroma, y el contenido nutricional. Se ha observado que estos atributos se modifican a diferente velocidad durante el almacenamiento. Las observaciones en diversas frutas refrigeradas en aire o en atmósferas que contienen bajas concentraciones de oxígeno y/o elevadas de bióxido de carbono, indican que de estos atributos el primero que se modifica es el sabor y el aroma. En efecto, la vida poscosecha basada en el sabor y aroma es aproximadamente 3/5 de la vida poscosecha determinada por la apariencia física (Kader, 2003 y 2008).

En la actualidad, cada vez es más frecuente el número de consumidores que se quejan por la ausencia de sabor fresco de los jitomates vendidos en los supermercados. Los consumidores han manifestado su disposición a pagar más por un producto con mejor calidad de sabor (Bruhn y col., 1991). Debido a ello, es importante tratar de establecer el tiempo máximo de almacenamiento a baja temperatura en el que el jitomate conserve íntegro su aroma original, lo cual daría al consumidor un producto de máxima calidad de sabor. En forma paralela, los resultados del presente trabajo contribuyen a profundizar en el conocimiento del efecto de la refrigeración en el perfil químico y sensorial del jitomate; en particular, en la variedad saladette 7705 ampliamente cultivada en nuestro país. Asimismo, este trabajo aporta conocimiento acerca de los mecanismos bioquímicos y

moleculares que ocasionan los cambios en el aroma del jitomate almacenado en refrigeración.

En el presente trabajo se analizaron, en frutos partidos, los principales compuestos volátiles de impacto del aroma de jitomate: cis-3-hexenal, cis-3-hexenol, hexanal, hexanol, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, 2isobutilthiazol, linalool, guayacol y geranilacetona, los cuales se producen por las diversas vías metabólicas de síntesis de componentes del aroma. Se cuantificó tanto su presencia como su proporción, para determinar si el cambio en alguno de ellos en alguna etapa de la maduración está relacionado con un cambio en el perfil sensorial del fruto, evaluado por un panel de jueces entrenados.

Asimismo, se analizó si el cambio químico y sensorial del aroma de jitomate está relacionado con un cambio en la actividad de la enzima ADH, involucrada en la biosíntesis de algunos componentes volátiles importantes del aroma como el 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, hexanol y cis-3-hexenol.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la refrigeración (10 °C) en el perfil químico y sensorial del aroma del jitomate saladette (variedades W4043 y 7705) así como en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar los parámetros de calidad de jitomate, almacenado durante diferentes periodos a temperatura ambiente (20 °C) y en refrigeración (10 °C).
- 2) Determinar los niveles de algunos de los principales compuestos volátiles de impacto del aroma de jitomate, almacenado durante diferentes periodos a temperatura ambiente (20 °C) y en refrigeración (10 °C).
- 3) Determinar el perfil sensorial de jitomate almacenado durante diferentes periodos a temperatura ambiente (20 °C) y en refrigeración (10 °C).
- 4) Determinar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa de jitomate almacenado durante diferentes periodos a temperatura ambiente (20 °C) y en refrigeración (10 °C).
- 5) Determinar la relación entre los niveles de algunos de los principales compuestos volátiles de impacto del aroma de jitomate, su perfil sensorial y la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en frutos almacenados durante diferentes periodos a temperatura ambiente (20 °C) y en refrigeración (10 °C).

4 HIPÓTESIS

1) Ho: El perfil químico característico del aroma típico del jitomate fresco será el primer atributo de calidad que cambie durante el almacenamiento refrigerado, en un nivel tal que será percibido sensorialmente por un grupo de jueces entrenados. La detección sensorial de este cambio marcará el fin de la vida poscosecha de este fruto y no los cambios de textura y apariencia como tradicionalmente se ha considerado.

2) Ho: El cambio en el perfil químico del aroma de jitomate, y en consecuencia el cambio en sus características sensoriales, podrían explicarse por la modificación de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa de jitomate durante el almacenamiento de los frutos en refrigeración.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico y tratamientos

Durante el presente trabajo de investigación se trabajó, en una primera etapa, con jitomate saladette 'W4043' cultivado en el estado de Morelos. Posteriormente en una segunda etapa, se utilizó jitomate saladette variedad 7705 cultivado en el Estado de Hidalgo. Los frutos de ambas variedades fueron cultivados en invernaderos comerciales y se cosecharon el mismo día del inicio del experimento, seleccionándose en un estado de madurez naranja por miembros de nuestro grupo de Investigación.

Los frutos fueron transportados a la UAM-Iztapalapa donde se seleccionaron buscando que tuvieran uniformidad de forma, tamaño, grado de madurez y ausencia de defectos físicos.

5.2 Diseño experimental

Los jitomates (532 frutos) se lavaron y dividieron en forma aleatoria en 2 lotes, uno de los cuales se almacenó en refrigeración a 10 °C y el otro a una temperatura de 20 °C con un $86 \pm 2\%$ y un $83 \pm 2\%$ de humedad relativa respectivamente.

Para la determinación de las variables durante el análisis inicial (0 días de almacenamiento) y el almacenamiento se utilizaron 18 frutos (6 jitomates por triplicado), evaluándose los parámetros de calidad y la actividad de la enzima ADH. Otros 18 frutos (6 jitomates por triplicado) se utilizaron para la determinación de la actividad respiratoria, la producción de etileno y los niveles de compuestos volátiles del aroma. Finalmente, otros 20 frutos fueron utilizados por los jueces

para la evaluación sensorial. El análisis inicial se hizo a los 0 días de almacenamiento y se tomaron muestras de los frutos a los 6, 9, 14 y 20 días para cada temperatura de almacenamiento. Para la evaluación de la pérdida de peso, se seleccionó un lote de 84 frutos que se dividió aleatoriamente en 7 repeticiones de 6 jitomates para cada temperatura de almacenamiento.

5.3 Pérdida de peso (PP)

Se registró el peso inicial así como el peso a los 6, 9, 14 y 20 días de almacenamiento, para cada temperatura, utilizando una balanza granataria digital con precisión de 0.1 g (OHAUS, GT4100, Florham Park, N. J. USA). La PFP se reportó como porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% PP = (1 - P_n / P_i) \cdot 100$$

Donde

%PP = porcentaje de pérdida de peso

P_n = peso de los frutos a los n días de almacenamiento

P_i = peso inicial de los frutos.

5.4 Determinación de parámetros de calidad

Para la determinación de la calidad del jitomate se evaluaron los siguientes parámetros físico-químicos.

5.4.1 Color

El análisis de color se realizó con un colorímetro ColorFlex 45/0 (Hunter Lab, 114 Sunset Hills, Reston, VA 20190) en muestras de 6 jitomates por triplicado de los

frutos recién cosechados y posteriormente en los que habían sido almacenados en cada una de las temperaturas y muestreados en los tiempos previamente mencionados. Se determinaron los tres parámetros que definen el color: la luminosidad o claridad (L^*), la cromaticidad o saturación(C^*) y el tinte o matiz (h).

5.4.2 Firmeza

La firmeza se determinó en los mismos frutos a los que previamente se les había medido el color. Para ello, a cada fruto se le eliminó una pequeña porción de la epidermis y en esa región se aplicó presión con un punzón de 7 mm de diámetro de un penetrómetro (Effe-Gi, Milan, Italy), midiéndose la fuerza en kg necesaria para que el punzón penetrara el pericarpio. Posteriormente, los kg fuerza fueron transformados a Newtons (N).

A los frutos a los que previamente se les había medido el color y la firmeza, se les extrajo el jugo, utilizando un exprimidor casero. Las muestras de jugo de cada una de las 3 repeticiones de 6 jitomates se utilizaron inmediatamente para el análisis de sólidos solubles totales y la determinación de la acidez titulable. El resto del jugo se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador hasta su uso para la determinación de azúcares reductores y azúcares totales.

5.4.3 Sólidos solubles totales (SST)

A las muestras de jugo se les midió el contenido de SST, expresado en % utilizando un refractómetro manual (Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan). Para la determinación se tomó una gota de jugo y se colocó en el refractómetro, previamente calibrado con agua destilada.

5.4.4 Acidez titulable (AT)

Se pesaron 5 g de las muestras de jugo, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se agregaron 3 gotas de fenolftaleína. En seguida se tituló con NaOH 0.1N hasta obtener un color rosa pálido que persistió aproximadamente 10 segundos. La AT se expresó en % de ácido cítrico (el ácido dominante en el jitomate) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ac. Cítrico} = \frac{(\text{vol NaOH}) (\text{concentración de NaOH}) (\text{meq de Ac. cítrico}) (100)}{\text{g de jugo}}$$

5.4.5 Azúcares reductores y totales

5.4.5.1 Azúcares reductores

Las muestras de jugo se descongelaron y se diluyeron 1:40 con agua desionizada. Se mezcló 1 mL de jugo diluido con 1 mL de la solución de DNS (solución al 1% (p/v) de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que contenía 0.2% de fenol, 0.05% de Na₂SO₃ y 1% de NaOH) en tubos de ensayo (Miller 1959). Los tubos se cerraron y se colocaron en baño María en ebullición, durante 5 min. Posteriormente, se enfriaron en baño de hielo y a cada uno de los tubos se le agregaron 10 mL de agua desionizada. Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman (Serie DU-250).

5.4.5 2 Azúcares totales

Se tomaron 2.5 mL de jugo de jitomate diluido (1:2.5 con agua desionizada) y se mezclaron en tubos de ensayo con 2.5 mL de HCl 2N. La mezcla se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó con

NaOH 1N, a pH 7 y se aforó a 25 mL con agua. Se tomó 1 mL de esta solución y se mezcló con 1 mL de la solución de DNS al 1% (p/v) antes mencionada. Los tubos se cerraron y se colocaron en un baño María en ebullición durante 5 min, continuándose con los mismos pasos ya descritos para la determinación de azúcares reductores.

5.5 Determinación de etileno y actividad respiratoria

5.5.1 Procedimiento de análisis

Se utilizó la metodología del espacio de cabeza, para lo cual se colocaron 6 jitomates completos (por triplicado) dentro de frascos de vidrio con una capacidad de 2300 mL tapados herméticamente. La tapa metálica tenía un orificio cubierto con un septo por donde se tomaron las muestras gaseosas. Con el propósito de que se acumularan mayores concentraciones de CO₂ y etileno, los frascos se colocaron en una estufa a 30 °C durante 1 hora. Para el muestreo de gases, se tomó 1 mL del volumen de aire (espacio de cabeza) con una jeringa de 5 mL y se inyectó al cromatógrafo Gow Mac para el análisis de CO₂. Posteriormente se tomó otra muestra de 1 mL y se inyectó en el equipo Varian 3900, para determinar la concentración de etileno.

5.5.2 Condiciones cromatográficas

El análisis de etileno se realizó en un cromatógrafo de gases Varian 3900, utilizando una columna HP-Plot Al₂O₃ (óxido de aluminio activado), con una longitud de 50 m, 0.535 mm de diámetro interno y con un detector de ionización de flama (DIF). Se utilizó el siguiente programa de temperatura se inició a 80 °C,

permaneciendo en esta temperatura durante 15 min y subiendo a 150 °C a razón de 20 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 200 °C.

La actividad respiratoria se determinó en un cromatógrafo de gases Gow Mac de baja sensibilidad, utilizando un detector de conductividad térmica (DCT). El CO₂ se cuantificó isotérmicamente a 100 °C. La temperatura del inyector y la del detector fue de 100 °C. Se encontró que el tiempo de retención del CO₂ es 0.52 min en una mezcla de CO₂ al 10% en aire.

5.6 Análisis químico de los compuestos volátiles del aroma de jitomate

Se extrajo el jugo de los jitomates a los que se les determinó la concentración de etileno y la actividad respiratoria. A una muestra de 18 mL del jugo de 6 jitomates se le agregaron 2mL de una solución de EDTA 0.5 M disuelto en NaOH 0.63 M, para estabilizarlo. Inmediatamente, la muestra se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -70 °C en un ultracongelador hasta que se usó para la determinación de compuestos volátiles del aroma de jitomate. La determinación se realizó dos veces en cada triplicado.

Los aromas se analizaron mediante el método estático de muestreo en el espacio de cabeza, realizando la adsorción de los aromas en una fibra, por la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) (Pelayo y col 2005; Pelayo y col., 2007). Se probaron 4 tipos de fibras: Carboxen/Polydimethylsiloxano (CAR/PDMS); Polydimethylsiloxano (PDMS); Polydimethylsiloxano/Divinylbenzeno (PDMS/DVB), y la que mejor resultado dio fue la de Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS).

Se hicieron varios intentos para determinar los compuestos volátiles del aroma directamente en jitomate completo, pero debido a la baja concentración de éstos, solo se pudo determinar en algunas muestras la presencia de trans-2-hexenal, hexanal, 2-isobutiltiazol y algunas veces 3-metilbutanol, por lo que se decidió realizar el análisis en muestras de jugo de jitomate.

En un vial de 10 mL se pesaron 1.2 gramos de cloruro de sodio, se añadieron 10 μ L de nonanol a 200 ppm y 10 μ L de acetona a 200 ppm (como estándares internos) y 3 mL de jugo de jitomate. Inmediatamente se tapó el frasco con un septo, se colocó un aro metálico y se selló herméticamente con una engargoladora. Se agitó durante 1 min en un vortex y se colocó en un multiblock para mantenerlo a temperatura constante de 30 °C. Se insertó una fibra SPME (DVB/CAR/PDMS) dentro del frasco vial y se expuso durante 10 min en el espacio de cabeza para que adsorbiera los aromas presentes. Posteriormente, la fibra se desorbió térmicamente a 250 °C durante 5 min, en el inyector del cromatógrafo de gases, probándose que con este tiempo de desorción la fibra no conservaba volátiles de la inyección anterior después de cada inyección. Se evaluaron asimismo, diferentes tiempos de adsorción, encontrándose que 10 min era el más conveniente.

5.6.1 Condiciones cromatográficas

El análisis por cromatografía de gases de los compuestos volátiles del aroma se realizó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5800 series II, Palo Alto, USA) utilizando una columna DB-WAXETR, con una longitud de 60m, 0.32 mm de diámetro interno y 1 μ m de fase estacionaria (J & W Scientific, Folsom, USA) y un

detector de ionización de flama (DIF). Se utilizó el siguiente programa de temperatura: se inició a 60 °C manteniéndose en esta temperatura durante 90 min y luego subiendo a 230 °C a razón de 2 °C/min, para permanecer en esta temperatura durante 15 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 °C y 280 °C, respectivamente.

En el primer experimento se usaron el mismo cromatógrafo y columna pero fue diferente el programa de temperatura, el cual inició a 100 °C y luego se subió a 220 °C a razón de 15 °C/min, para permanecer en esta temperatura durante 7 min. Posteriormente, se incrementó nuevamente la temperatura de la columna a 250 °C a razón de 10 °C/min, permaneciendo en esta temperatura durante 5 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron en ambos casos de 250 °C.

5.6.2 Identificación de los compuestos volátiles

La identificación de los compuestos del aroma se hizo por comparación con los espectros de la biblioteca y se confirmó con estándares puros. La metodología que se utilizó fue la misma que para la determinación de los compuestos volátiles en el jugo de jitomate. Se utilizaron 3 mL de una solución que contenía 25 de ppm de hexanal, 10 ppb de 3-metilbutanol, 10 ppb de 3-metilbutanal y 2 ppb de cada uno de los siguientes compuestos trans-2-hexenal, trans-3-hexen-1-ol, cis-3hexen-1-ol, hexanol, 2-isobutiltiazol, linalool, guayacol y geranilacetona. Posteriormente, se añadieron el NaCl, el nonanol y la acetona a las concentraciones ya indicadas, se tapó el frasco con un septo, se selló y se cerró herméticamente. Se agitó durante 1 min en un vórtex y se colocó en una parrilla multiblock para mantenerlo a una temperatura constante de 30 °C. Se insertó una fibra SPME (DVB/CAR/PDMS)

dentro del frasco vial y se expuso durante 10 min en el espacio de cabeza del frasco para que adsorbiera los aromas presentes. Posteriormente, la fibra se desorbió térmicamente a 250 °C durante 5 min, en el inyector del cromatógrafo de gases.

5.6.3 Condiciones cromatográficas para la identificación de compuestos volátiles

Para la identificación de los compuestos volátiles del aroma de jitomate se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5800 series II, Palo Alto, USA) acoplado a un detector selectivo de masas (Hewlett Packard 5800 series 5972, Palo Alto, USA) operado a una velocidad de 4 scans/s con un rango de masas (m/z) de 40-450, con una fuente de ionización de impacto electrónico de 70 eV y con un analizador de iones de tipo cuadrupolo. La biblioteca usada para identificar los compuestos fue la NBS 75 KL, para volátiles del medio ambiente y se confirmó por comparación con estándares químicos puros. Se utilizó una columna DB-WAXETR, con una longitud de 60 m, 0.32 mm de diámetro interno y 1µm de fase estacionaria (J & W Scientific, Folsom, USA) y un programa de temperatura que inició a 100 °C y luego fue subiendo hasta 110 °C a razón de 5 °C/min; posteriormente se elevó la temperatura hasta 220 °C a una velocidad de 15 °C/min, permaneciendo en esta temperatura durante 20 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 °C y 280 °C, respectivamente.

5.7 Cuantificación de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa

5.7.1 Extracción de la enzima

La extracción y la cuantificación de la enzima se hicieron, de acuerdo con lo reportado por Longhurst y colaboradores (1990), con algunas modificaciones. Para la extracción, se utilizaron cinco gramos de pericarpio fresco, los cuales fueron homogenizados en 10 mL de un amortiguador frío de Tris-HCl, 1M pH 7.4, que contenía DTT 5 mM, EDTA 1 mM y PVPP 1% (p/v), usando arena de mar como abrasivo para romper las paredes celulares. El homogenado se centrifugó a 12000 × g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se usó directamente como extracto enzimático.

5.7.2 Actividad de la enzima

La actividad de la enzima se midió a 25 °C ± 2 °C determinando el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la acumulación de NADH por medio de un espectrofotómetro (Beckman DU 650, Fullerton, USA). La mezcla de reacción contenía 1 mL de NAD⁺ 1 mM en amortiguador de Glicina-KOH 50 mM pH 9.6 y 1 mL de extracto enzimático. La reacción se inició al añadir 1 mL de etanol 0.5 M. La mezcla de reacción se agitó y se midió el cambio en su absorbancia durante 3 min. La actividad de la enzima se determinó tres veces en cada uno de tres diferentes extractos. Se consideró que 1 unidad de ADH es la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de NADH/min. El contenido de proteína fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.8 Expresión del gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa 2 (ADH2) de jitomate

5.8.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó usando la técnica de Trizol (Invitrogene®) modificada para tejidos vegetales de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La modificación realizada consistió en agregar un paso extra en la extracción usando isopropanol y una mezcla de citrato de sodio 0.8 M/cloruro de sodio 1.2 M con la finalidad de precipitar los carbohidratos presentes en las muestras (debido a que las células vegetales tienen altos contenidos de estos compuestos).

Una muestra de 0.2 g de pericarpio liofilizado se pulverizó con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1 mL del reactivo de Trizol por cada 0.05 - 0.1g de tejido y se homogenizó. Se incubó el homogenado durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Al sobrenadante se le añadieron 200 µL de cloroformo por mL de Trizol, se agitó con un vórtex durante 30 s y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. Se repitió el procedimiento. Al sobrenadante se le añadieron 250 µL de isopropanol y 250 µL de la mezcla de citrato de sodio 0.8M /cloruro de sodio 1.2 M. Se mezcló por inversión suave y se incubó 10 min a temperatura ambiente, centrifugándose posteriormente a 12000 x g durante 10 min a 4 °C.

La pastilla de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 75% (v/v) recién preparado y frío. Se centrifugó a 10000 x g durante 10 min a 4 °C. Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Beckman GS-100 con un rotor F2402.

La pastilla de ARN obtenida se secó al aire con una lámpara durante 20-30 min y posteriormente se resuspendió con 50 µL de agua tratada con DEPC, almacenándose a -20 °C. La concentración y la pureza del ARN obtenido se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro (Beckman DU 650, Fullerton, USA), la concentración se determinó haciendo los cálculos utilizando la absorbancia a 260 nm y la pureza determinando la relación 260/280. La integridad se determinó utilizando geles de agarosa al 1%.

5.8.2 Cebadores

Con el objetivo de determinar la expresión del gen que codifica para la enzima ADH2 se utilizaron cebadores específicos, basados en la secuencia del gen *adh2* de jitomate (acceso X77233). FW AAC CCT CTT GCT CCT CTT G, RV CAG CCA TCA TGG ACA CAT T. El tamaño aproximado del fragmento es de 500 pb.

Se utilizó la expresión de actina de jitomate, un gen constitutivo, para usarlo como sonda de normalización. Las secuencias de los cebadores para este gen fueron FW TGG CAT CAT ACC TTT TAC AC, RV TCC GGG CAT CTG AAC CTC TC.

5.8.3 Amplificación por RT-PCR

Una vez que se verificó la integridad de las muestras a partir del ARN total se realizó la estandarización de las condiciones de la RT-PCR. La síntesis de la

primera cadena de ADNc se llevó a cabo a 55 °C durante una hora, usando los cebadores específicos descritos en el punto anterior. La amplificación por PCR se realizó en las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización previo a 94 °C durante 5 min y 26 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C ó 60 °C durante 60 s y 72 °C durante 60 s. Las muestras se almacenaron a –70 °C hasta su uso.

La expresión se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) con amortiguador TAE (Tris- ácido acético 1mM, EDTA 0.5 M, pH 8.5) a 95 volts durante 1.5 h. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio 0.1µM durante 15 minutos. En cada caso se realizó una densitometría utilizando el programa ImageJ.

5.9 Evaluación sensorial del aroma y sabor del jitomate

5.9.1 Entrenamiento de jueces para las pruebas de evaluación sensorial

Se realizó el reclutamiento, selección y entrenamiento de jueces que hicieron las pruebas sensoriales en el presente trabajo. Para ello, en una primera etapa se invitó a alrededor de 60 alumnos y administrativos de la UAM-I a participar como jueces en algunas pruebas sensoriales de jitomate. A los que mostraron interés se les aplicó una encuesta para conocer si eran o no aptos para pasar a una siguiente etapa, donde se seleccionaron a los mejores por sus aptitudes e interés. Posteriormente, a los jueces seleccionados se les dió un entrenamiento para que pudieran discriminar si 2 ó más jitomates tenían aroma igual o diferente. Asimismo, se entrenaron para que pudieran generar descriptores de algunos de los compuestos químicos más importantes que forman parte del aroma del

jitomate, y al final culminar con el hecho de que pudieran cuantificar los niveles de estos descriptores.

Durante la fase de selección se aplicaron 4 pruebas, 1 cada semana, en las que se evaluó la capacidad de los posibles jueces para describir aromas, para ordenar soluciones de un determinado aroma de acuerdo a su concentración y para reconocer los componentes de una mezcla de aromas. Asimismo, se les mostró la manera de efectuar el llenado de cuestionarios (Anexo 3). Otro aspecto al que se le dio gran importancia en la selección de los jueces fue la constancia para asistir a las diferentes sesiones. Al final de esta etapa quedaron 20 jueces.

El entrenamiento consistió en 13 pruebas sensoriales semanales, por medio de las cuales se les enseñó a los jueces a reconocer, en primer lugar, que el aroma característico del jitomate está formado por la mezcla en proporciones adecuadas de muchos compuestos químicos aromáticos. En particular, se trabajó con 11 compuestos sintetizados por las distintas vías metabólicas que generan compuestos volátiles, de los 400 que conforman el aroma del jitomate. Estos compuestos fueron: linalool, guayacol, hexanal, trans-2-hexenal, 2-isobutiltiazol, hexanol, geranilacetona, trans-3-hexenol, cis-3-hexenol, 3-metilbutanol o alcohol isoamilíco y 3-metilbutanal o isovaleraldehído.

Los jueces asignaron por consenso a estos 11 compuestos el o los descriptores que mejor describían su aroma (Cuadro 1). Al final del entrenamiento los jueces fueron capaces de reconocer en cada prueba sensorial descriptiva cada uno de estos diferentes aromas y evaluar sus niveles de una manera cuantitativa en el olor del jitomate completo, partido y cuando lo degustaban. Al mismo tiempo, los jueces fueron capaces de reconocer similitudes y diferencias en el aroma de

jitomates que tenían diferente tiempo de almacenamiento o que habían sido almacenados en diferentes condiciones.

Cuadro 1

Descriptores asociados a compuestos del aroma de jitomate generados por un panel de jueces entrenados y las concentraciones usadas en las evaluaciones sensoriales realizadas en este estudio.

Descriptores	Compuestos volátiles	Concentración (ppm)	
		alta	media
té limón	linalool	40	20
medicinal	guayacol	20	10
manzana verde	hexanal	40	20
aceite de almendras	trans-2-hexenal	20	10
herbáceo	2-isobutiltiazol	20	10
floral-vegetal	hexanol	40	20
cítricos	geranilacetona	20	10
humedad solvente	trans-3-hexenol	80	40
jitomate verde	cis-3-hexenol	40	20
avinagrado	3-metilbutanol	160	80
aceite rancio	3-metilbutanal	40	20

5.9.2 Pruebas de evaluación sensorial

Los jueces así entrenados realizaron pruebas discriminativas y descriptivas con jitomates '7705' completos que fueron almacenados durante diferentes periodos a temperaturas de 10 y 20 °C, los jueces olieron cada uno de los frutos, posteriormente los partieron, los volvieron a oler y los degustaron. Las conclusiones a las que llegaban se vertían en un cuestionario donde se les preguntaba, en primer lugar, si el aroma de los jitomates problema (almacenados a 10 y 20 °C) era igual o diferente a un jitomate fresco recién cosechado al cual se le denominaba referencia. Posteriormente, se les preguntaba si los 11 descriptores del jitomate, con los que estaban ya familiarizados tenían niveles similares en las

diferentes muestras de la prueba. Para evitar que los jueces sesgaran sus apreciaciones del aroma y sabor por el origen, el color o la apariencia de las muestras, las pruebas se realizaron siempre en el Laboratorio de Evaluación Sensorial, el cual se acondicionó con una luz roja para enmascarar el color real del jitomate. De igual manera, siempre se usó un código de números seleccionados al azar para nombrar a las muestras problemas de jitomate. Durante la prueba, después de que los jueces habían olido los jitomates enteros se cambió el código a las muestras para evitar que los jueces evaluaran al jitomate partido con una tendencia similar a la que apreciaron en el jitomate completo. Por todo lo anterior, se consideró que la apreciación del aroma del jitomate por los jueces no presentó sesgos.

Las muestras siempre se ofrecieron a los jueces en recipientes de unicel con tapa hermética a temperatura ambiente. Los jitomates se sacaban de las cámaras de maduración (20 °C) y de refrigeración (10 °C) 24 horas antes del inicio de la evaluación sensorial para favorecer una mayor producción de aromas por los frutos y una mejor percepción por parte de los panelistas.

En el primer experimento donde a los jueces se les pidió una evaluación semicuantitativa se les aplicaron los cuestionarios 1 y 2 del anexo 3. En el segundo experimento, se pidió a los jueces una evaluación cuantitativa para lo cual se les aplicó el cuestionario 3 del anexo 3.

5.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Plus para Windows 4.0 (StatPoint, Inc. Rendón, USA). Los resultados de sólidos solubles totales, azúcares reductores, acidez titulable, firmeza, parámetros de color, concentraciones de compuestos volátiles y niveles de descriptores sensoriales fueron analizados con un ANOVA y el análisis de los efectos principales se llevó a cabo mediante una comparación de medias por la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$). Asimismo, se hizo un análisis de correlación entre los descriptores sensoriales del aroma y los compuestos volátiles ($p \leq 0.1$).

6 RESULTADOS

6.1 Variedad W4043

La mayor parte de los resultados del experimento realizado con la variedad W4043 procedente del estado de Morelos fueron publicados en el artículo “Effect of storage at 10 °C on aroma of tomato (*Lycopersicon esculentum*) saladet grown in Mexico” publicado en la revista Acta Horticulturae, el cual se incluye en el Anexo 1.

6.1.1 Pérdida de peso (PP)

La pérdida de peso fue más rápida y mayor en el jitomate ‘W4043’ almacenado a 20 °C comparado con el almacenado a 10 °C. El jitomate almacenado durante 10 días en la temperatura más alta (20 °C) perdió un porcentaje de peso similar (4%) al que perdió el jitomate días a 10 °C (Fig. 5).

6.1.2 Parámetros de calidad

La acidez titulable (AT) fue disminuyendo significativamente en el jitomate de esta variedad conforme avanzó el tiempo de almacenamiento en ambas temperaturas. Sin embargo, la velocidad con la que disminuyó la AT en los frutos a 20 °C fue significativamente mayor comparada con los almacenados en refrigeración, que en general presentaron valores superiores a los de los frutos almacenados a 20 °C (Fig. 6).

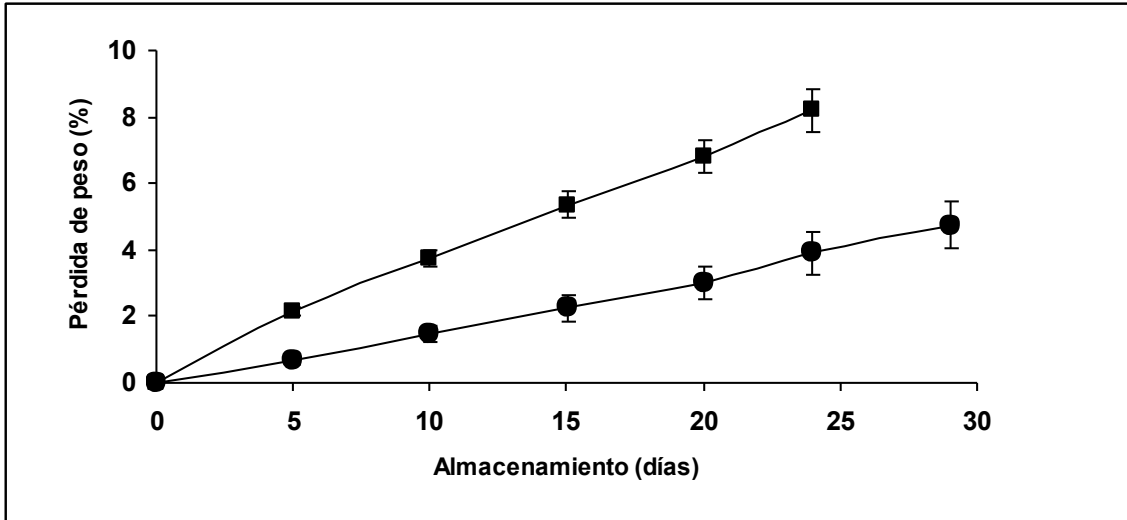


Fig. 5 Efecto de la temperatura en la pérdida de peso de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

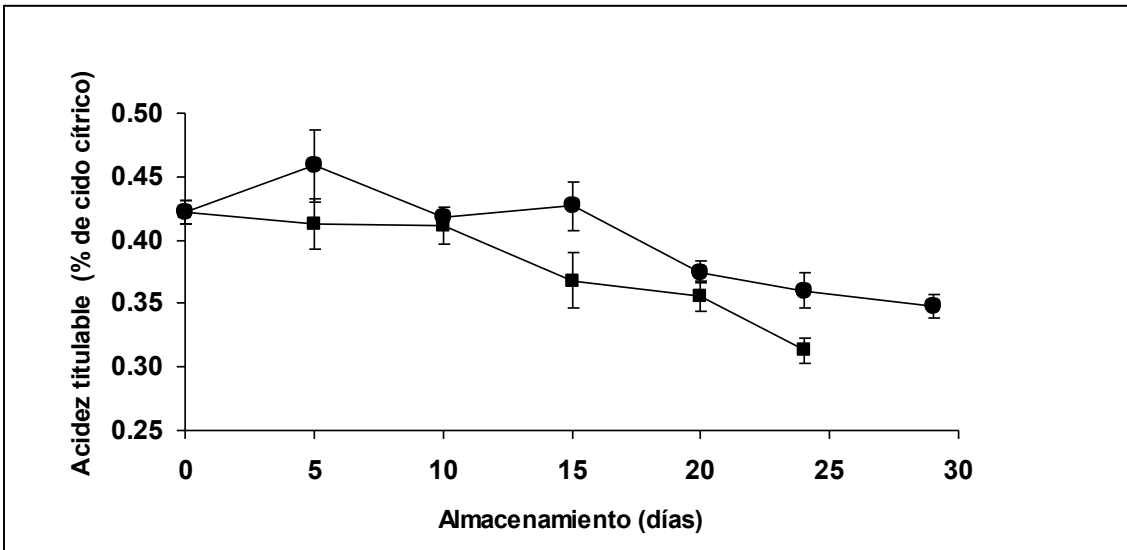


Fig. 6 Efecto de la temperatura en la acidez titulable de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

En los jitomates almacenados a 10 °C, los sólidos solubles totales se incrementaron en los primeros 5 días de almacenamiento y luego su concentración tendió a mantenerse constante durante el resto del almacenamiento. En los frutos almacenados a 20 °C los sólidos solubles

disminuyeron gradualmente hasta los 24 días de almacenamiento (Fig. 7). Siempre hubo un mayor contenido de sólidos solubles totales en el jitomate almacenado a 10 °C, en comparación con el almacenado a 20 °C.

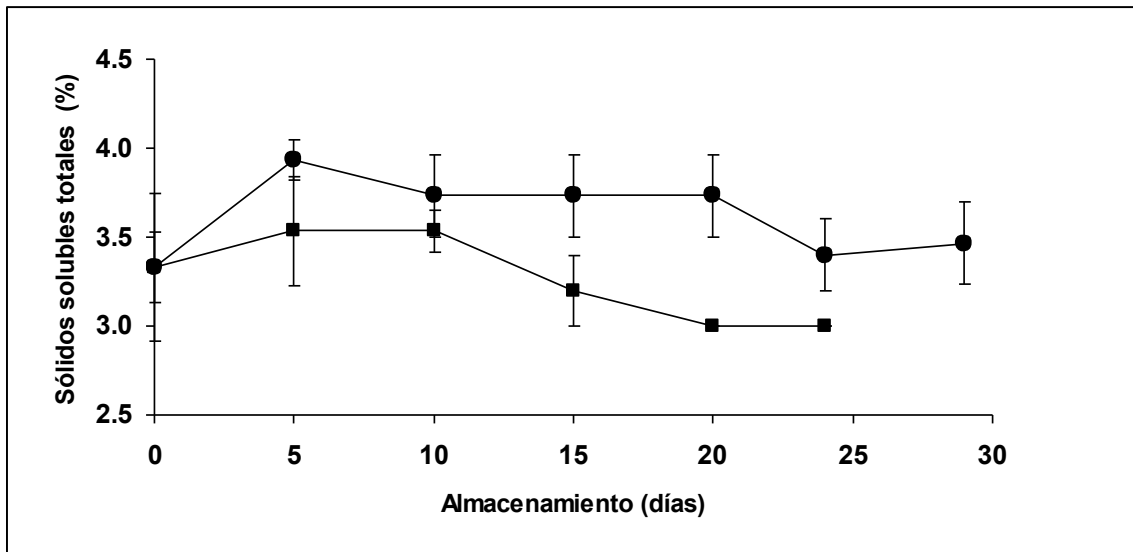


Fig. 7 Efecto de la temperatura en los sólidos solubles totales de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

Los parámetros L^* , el C^* y el h no se modificaron significativamente durante todo el tiempo de almacenamiento en ninguna de las temperaturas estudiadas (Figs. 8, 9 y 10). Estos 3 parámetros fueron ligeramente mayores, pero no significativamente diferentes (α 0.05), en el jitomate almacenado a 20 °C. Estos resultados indican que el color desarrollado por el jitomate almacenado a 10 y 20 °C fue similar.

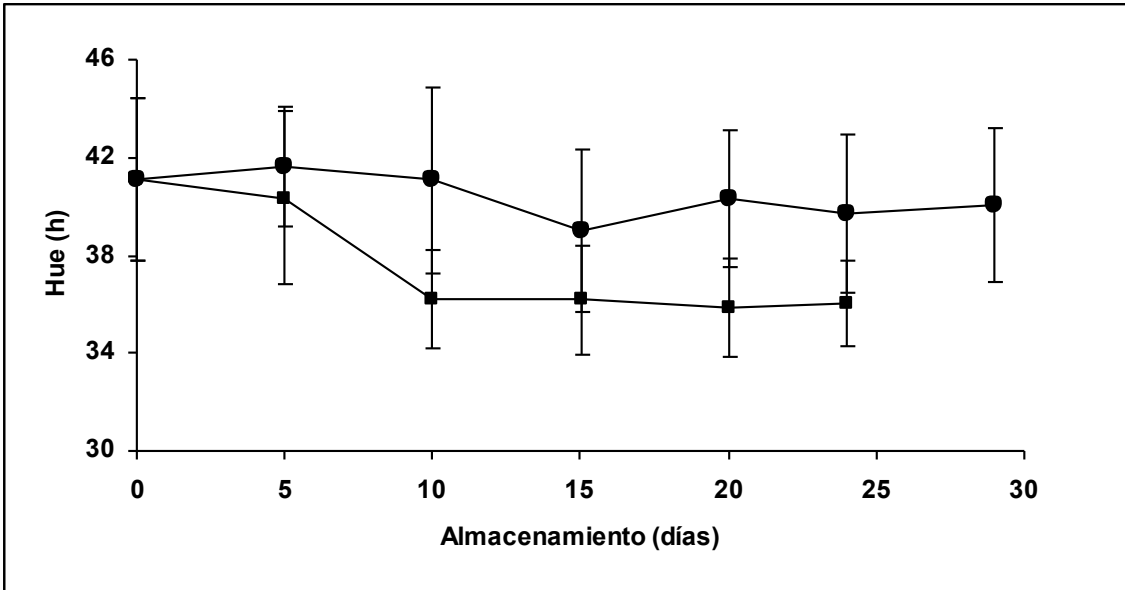


Fig. 8 Efecto de la temperatura en el ángulo hue o matiz (h) de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

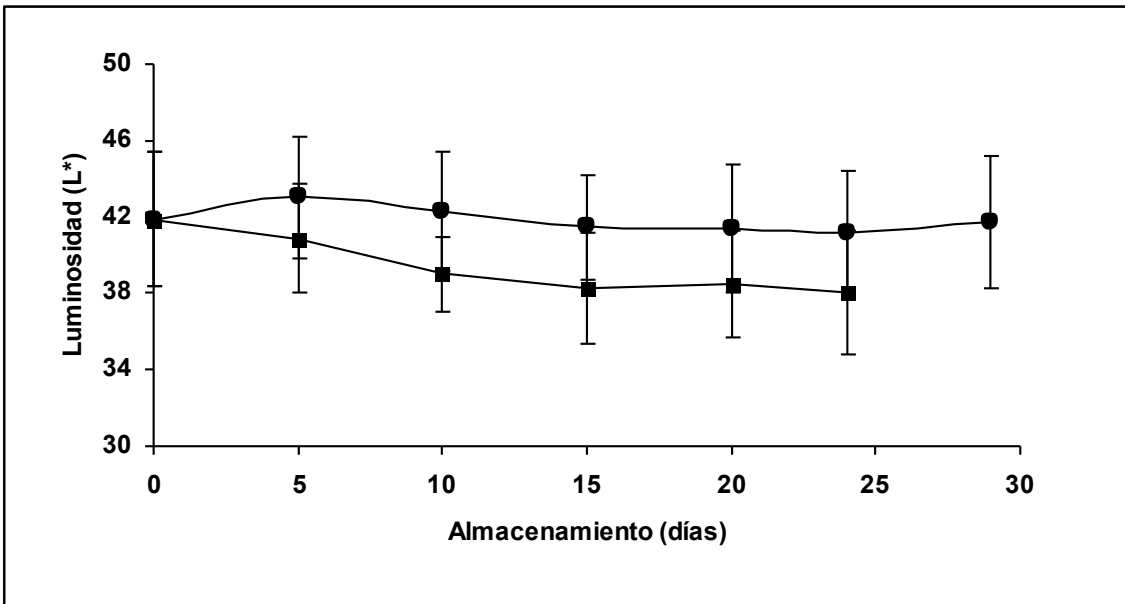


Fig. 9 Efecto de la temperatura en la luminosidad (L*) de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

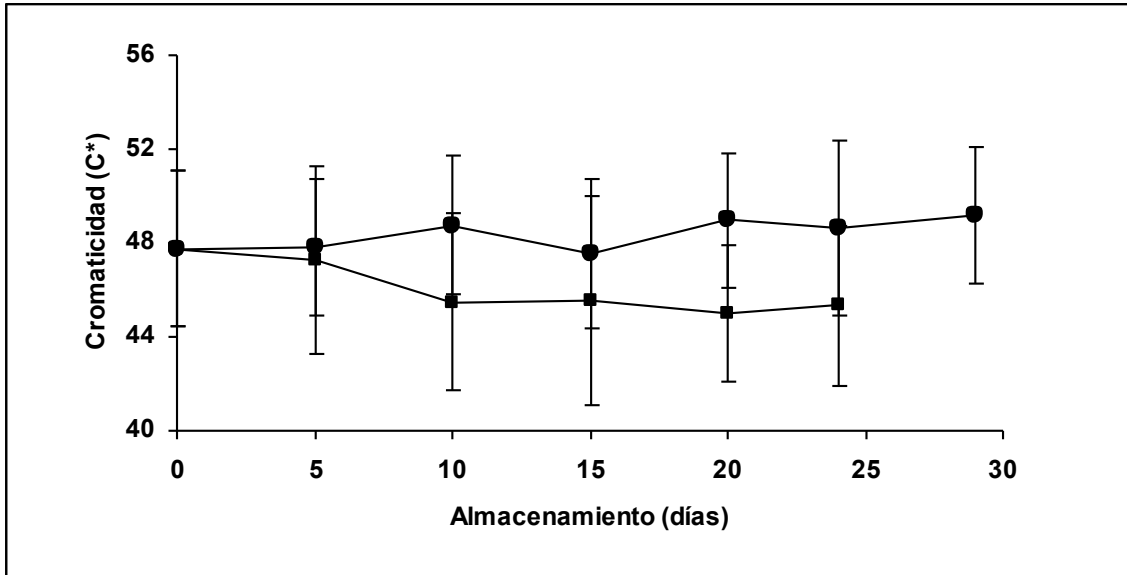


Fig. 10 Efecto de la temperatura en la cromaticidad (C*) de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

6.1.3 Etileno y actividad respiratoria

Se probaron diferentes condiciones y columnas para la cuantificación por cromatografía de gases de los niveles de etileno producido por el fruto completo durante su almacenamiento a 10 y 20 °C. En estas condiciones el tiempo de retención del estándar de etileno fue de 3.57 min. La Figura 11 muestra que la respiración de jitomate almacenado en ambas temperaturas (10 y 20 °C) fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo de almacenamiento; esta disminución fue mayor en el jitomate almacenado a 10 °C que en el almacenado a 20 °C. En relación con los niveles de etileno, en la Figura 12 se puede ver que en ambas temperaturas los niveles de esta hormona aumentaron significativamente a los 5 días de almacenamiento respecto al día 0 y luego disminuyeron en los frutos almacenados en refrigeración, mientras que permanecieron constantes en los frutos almacenados a 20 °C.

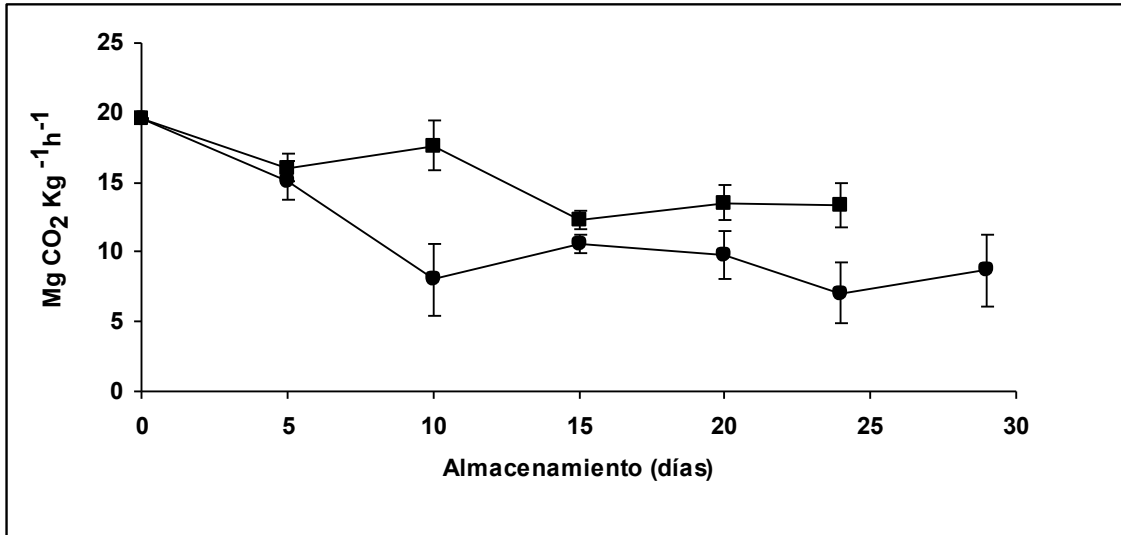


Fig. 11 Efecto de la temperatura en la actividad respiratoria de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

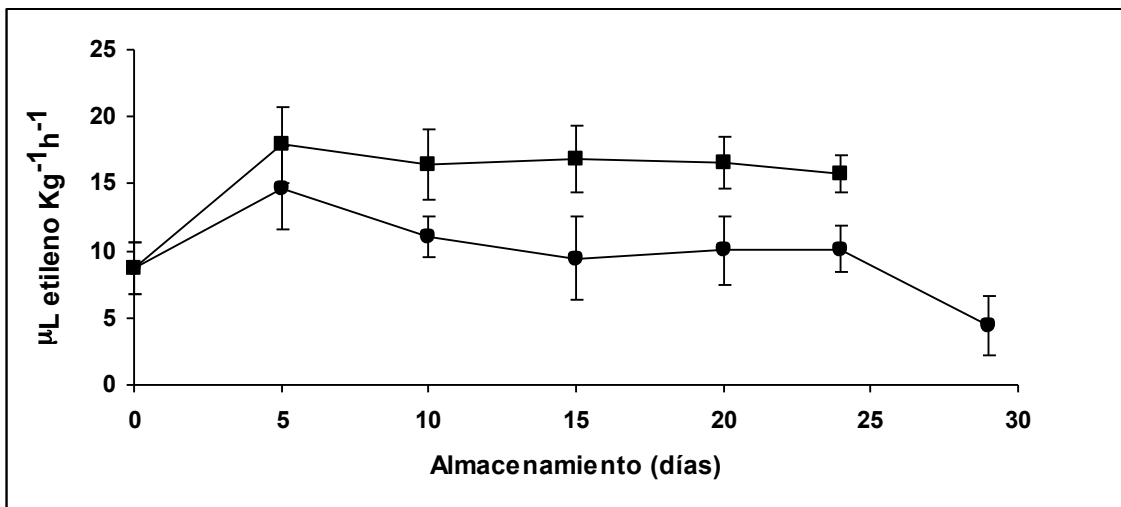


Fig.12 Efecto de la temperatura en la producción de etileno de jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

6.1.4 Efecto de la temperatura en los niveles de compuestos volátiles

Con el programa de temperatura utilizado para el análisis cromatográfico de compuestos volátiles de esta variedad no se pudieron detectar el aldehído 3-metilbutanal y el alcohol trans-3-hexenol.

Para mayor claridad de las graficas se decidió dividir entre 100 los valores de las unidades de área de todos los compuestos volátiles.

Los niveles de hexanol, cis-3-hexenol y hexanal aumentaron cuando esta variedad de jitomate se almacenó a 20 °C, mientras que los de 3-metilbutanol, geranilacetona, guayacol y linalool disminuyeron. Así mismo, los niveles de 2-isobutiltiazol y trans-2-hexenal no se modificaron en el jitomate almacenado a esta temperatura ($\alpha=0.05$) (Figs. 13,14 y 17).

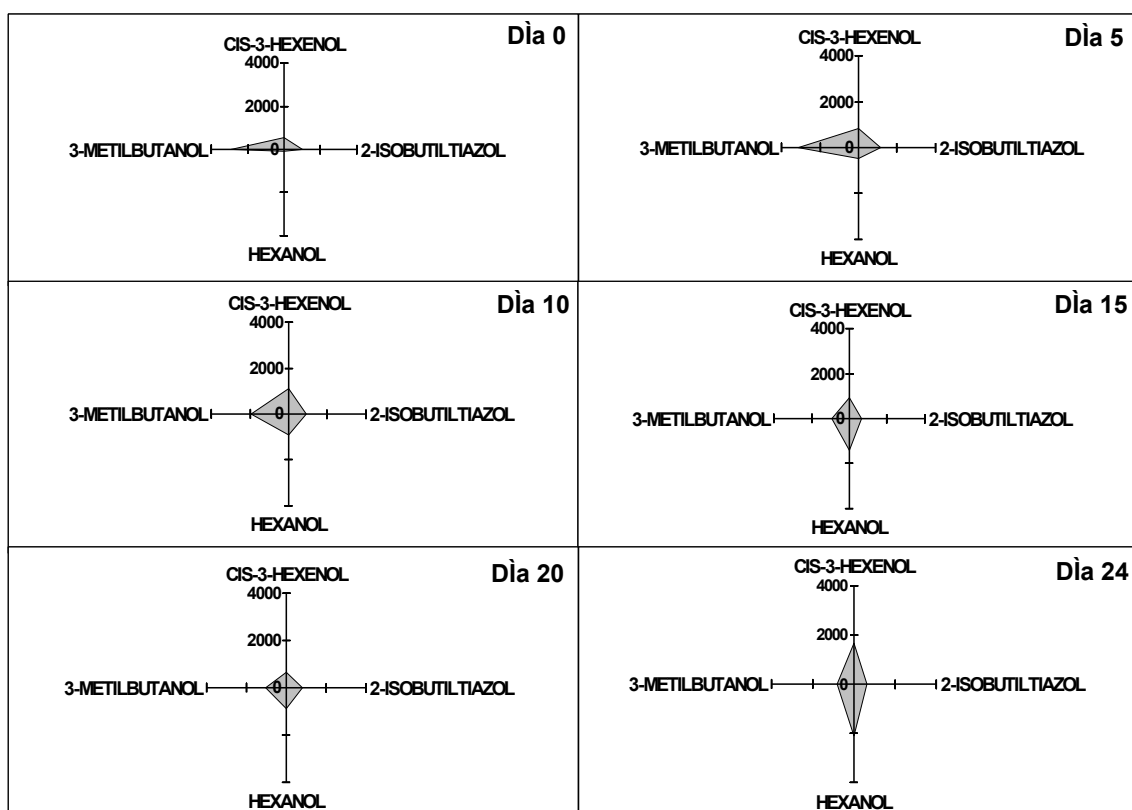


Fig.13 Efecto de la temperatura en los niveles de cis-3-hexenol, 2-isobutiltiazol hexanol y 3-metilbutanol del aroma del jitomate 'W4043' almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

Cuando el jitomate se almacenó en refrigeración, disminuyeron los niveles de geranilacetona, guayacol, linalool, 3-metilbutanol y 2-isobutiltiazol mientras que los

niveles de hexanol aumentaron. Los niveles de cis 3 hexenol, trans 2-hexenal y hexenal se mantuvieron constantes ($\alpha=0.05$) (Figs. 15, 16 y 17).

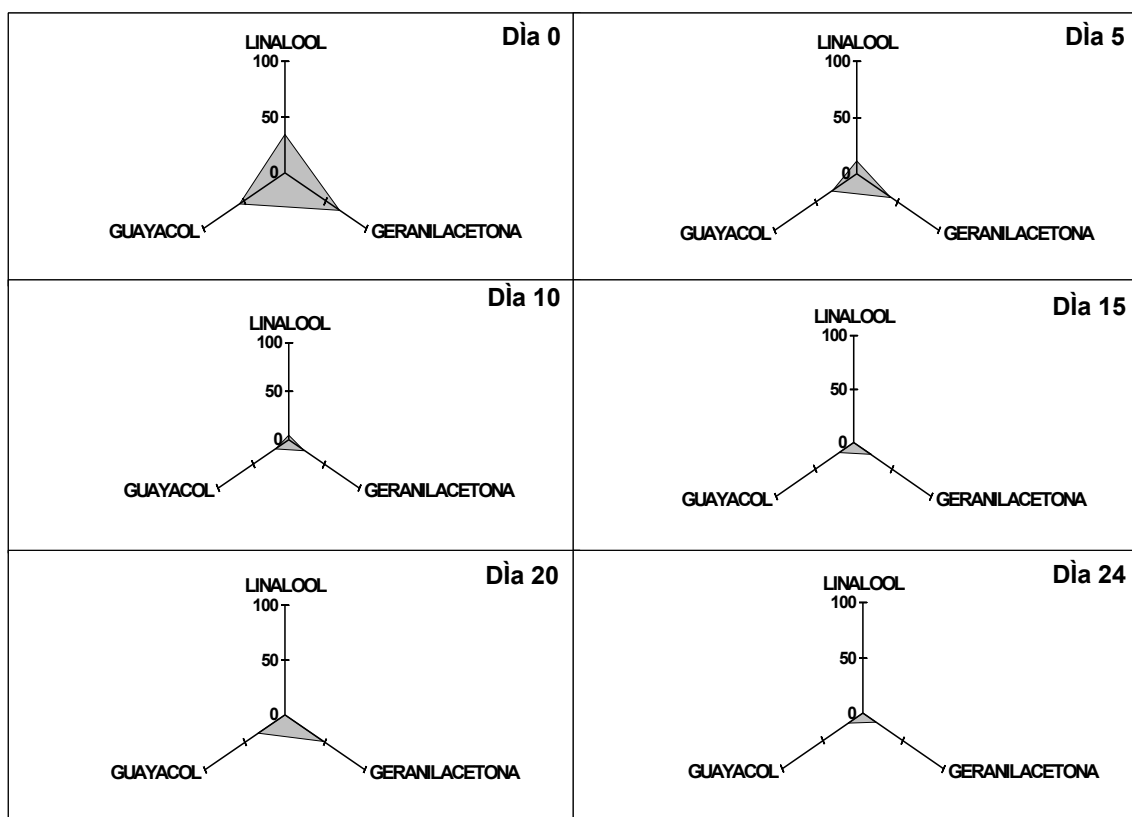


Fig.14 Efecto de la temperatura en los niveles de linalool, geranilacetona y guayacol del aroma del jitomate 'W4043' almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

Al comparar el cambio de compuestos volátiles en el jitomate almacenado en refrigeración comparado con los frutos mantenidos a temperatura ambiente encontramos que la refrigeración afectó a la acumulación de los compuestos volátiles cis-3-hexenol y hexenal, la concentración de los cuales se incrementó a 20 °C, mientras que a baja temperatura se mantuvo en niveles similares a los encontrados en el jitomate a los 0 días de almacenamiento (Figs. 13, 15 y 17). La refrigeración provocó también una disminución en la concentración de 2-

isobutiltiazol que no cambió cuando el jitomate se almacenó a temperatura ambiente (Figs. 13 y 15).

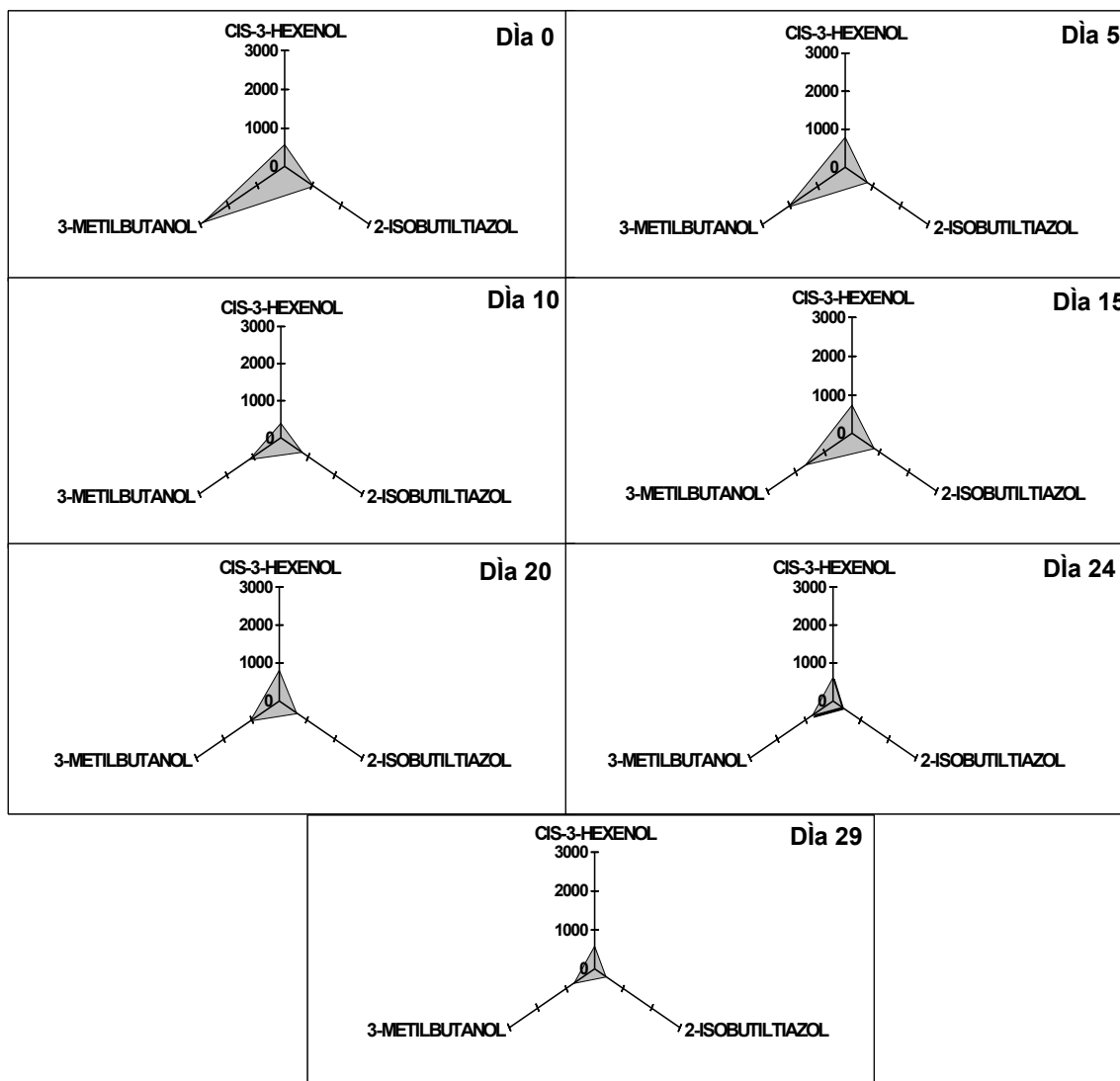


Fig.15 Efecto de la temperatura en los niveles de cis-3-hexenol, 2-isobutiltiazol y 3-metilbutanol del aroma del jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

La concentración de hexanol presentó un aumento en su concentración en ambas temperaturas, pero este incremento fue mayor en refrigeración (Figs. 13 y 16). Por su parte, los niveles de los compuestos volátiles geranilacetona, guayacol, linalool y 3-metilbutanol disminuyeron en forma similar durante el almacenamiento en

ambas temperaturas. Del mismo modo, los niveles de trans 2-hexenal permanecieron constantes en ambas temperaturas (Figs. 13, 14, 15 y 16).

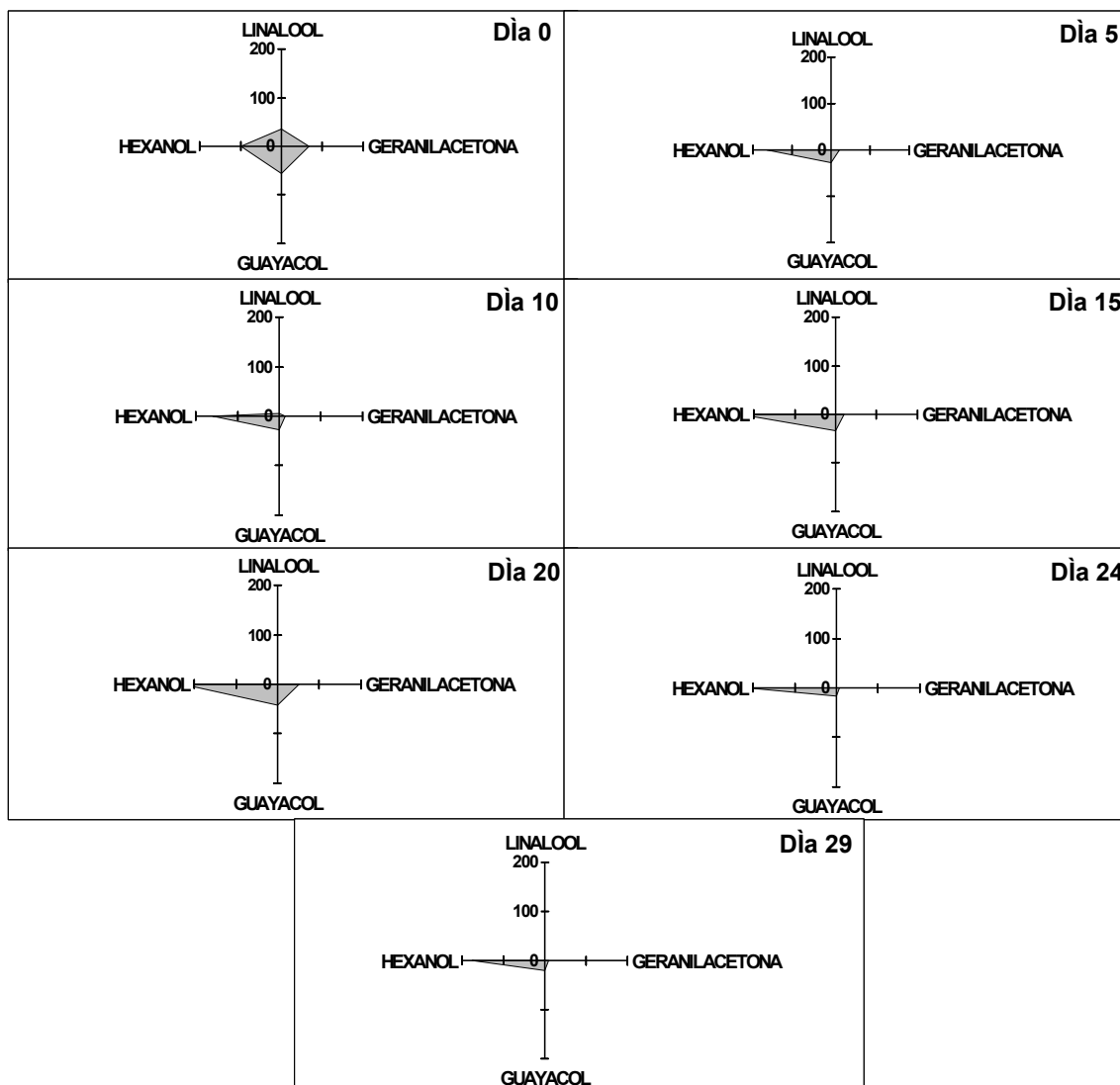


Fig.16 Efecto de la temperatura en los niveles de linalool, geraniacetona, guaiacol y hexanol del aroma del jitomate 'W4043' almacenado a 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

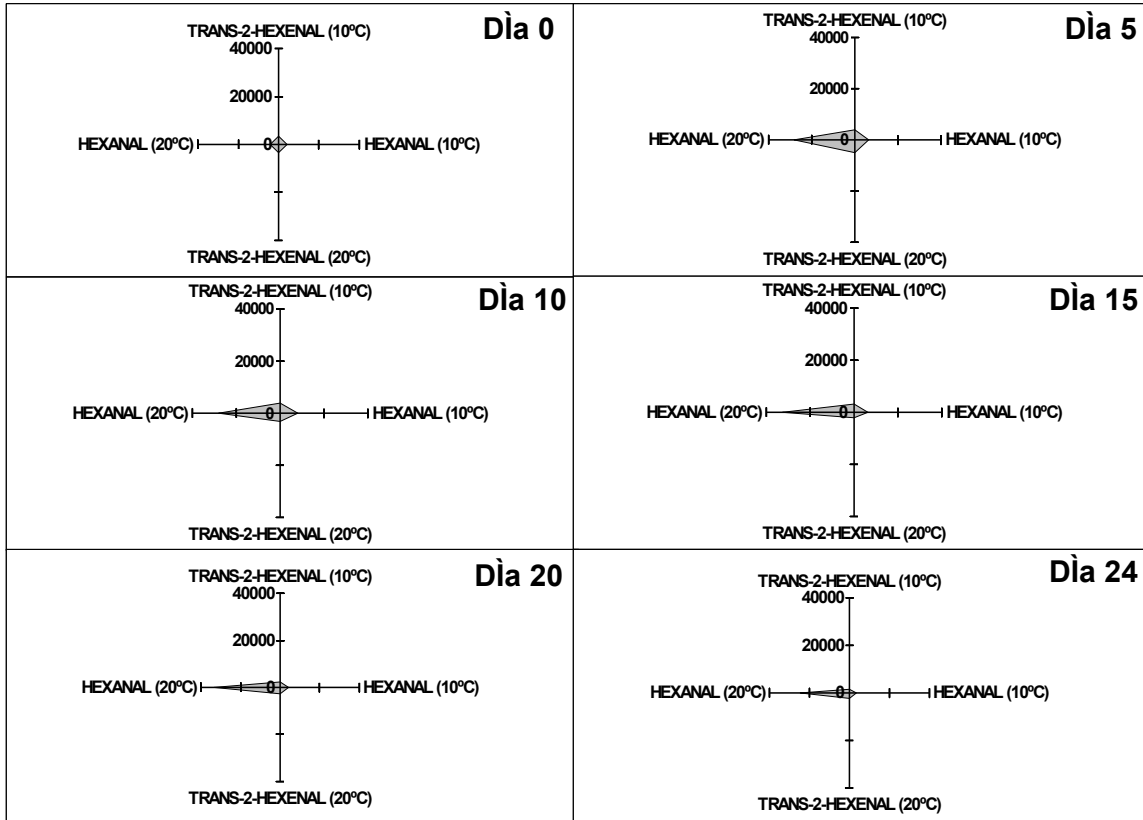


Fig.17 Efecto de la temperatura en los niveles de trans 2-hexenal y hexanal del aroma del jitomate 'W4043' almacenado a 20 °C y 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

6.2 Variedad 7705

La mayor parte de los resultados de la variedad 7705 cultivado en el estado de Hidalgo se encuentran reportados en el artículo “Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit” sometido para su publicación a Postharvest Biology and Technology, el cual se incluye en el Anexo 2.

6.2.1 Pérdida de peso (PP)

La pérdida de peso fue más rápida y mayor (12%) en el jitomate almacenado a 20 °C, en comparación con el almacenado a 10. °C (3%) (Fig. 18).

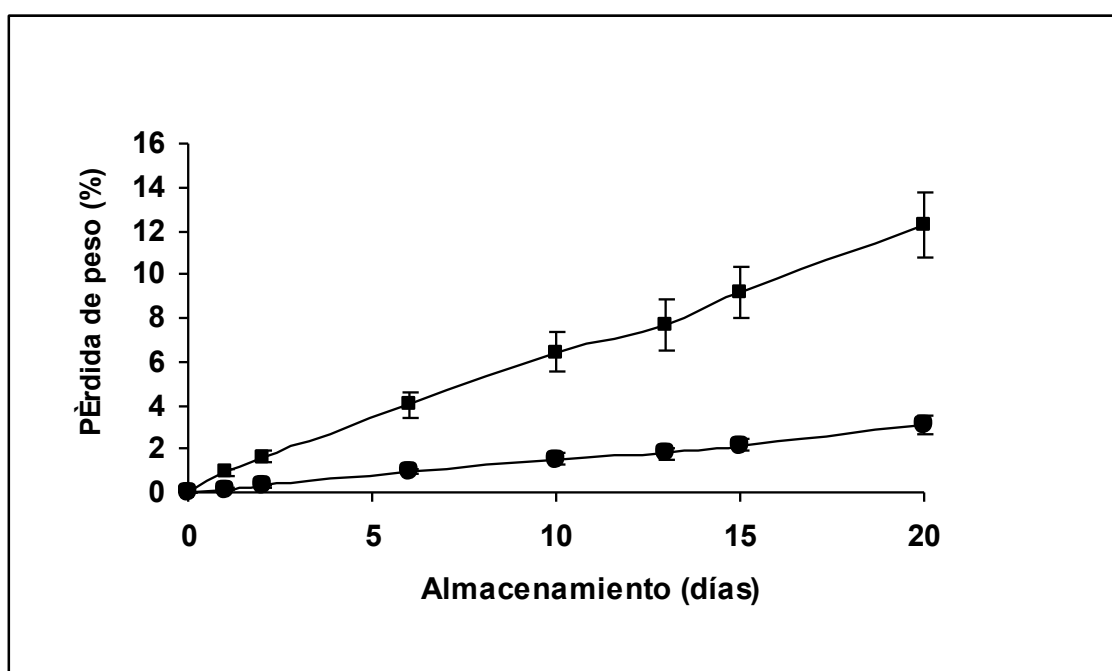


Fig. 18 Efecto de la temperatura en la pérdida de peso de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

6.2.2 Parámetros de calidad

Los niveles de los SST se mantuvieron constantes durante los primeros 15 días de almacenamiento en ambas temperaturas ($\alpha=0.05$), en comparación con el jitomate antes de ser almacenado. A partir del día 15 de almacenamiento, los niveles de los SST disminuyeron significativamente en el jitomate refrigerado respecto al jitomate al día cero de almacenamiento (Fig. 19).

La AT se mantuvo relativamente constante durante los primeros 15 días de almacenamiento a 10 °C, comparado con los niveles que presentaban los frutos del análisis inicial. En el jitomate almacenado 20 °C durante 9 días los niveles se mantuvieron similares a los del jitomate fresco. Posteriormente, el jitomate presentó una disminución significativa en los niveles de este parámetro de calidad en relación al jitomate fresco (Fig. 20).

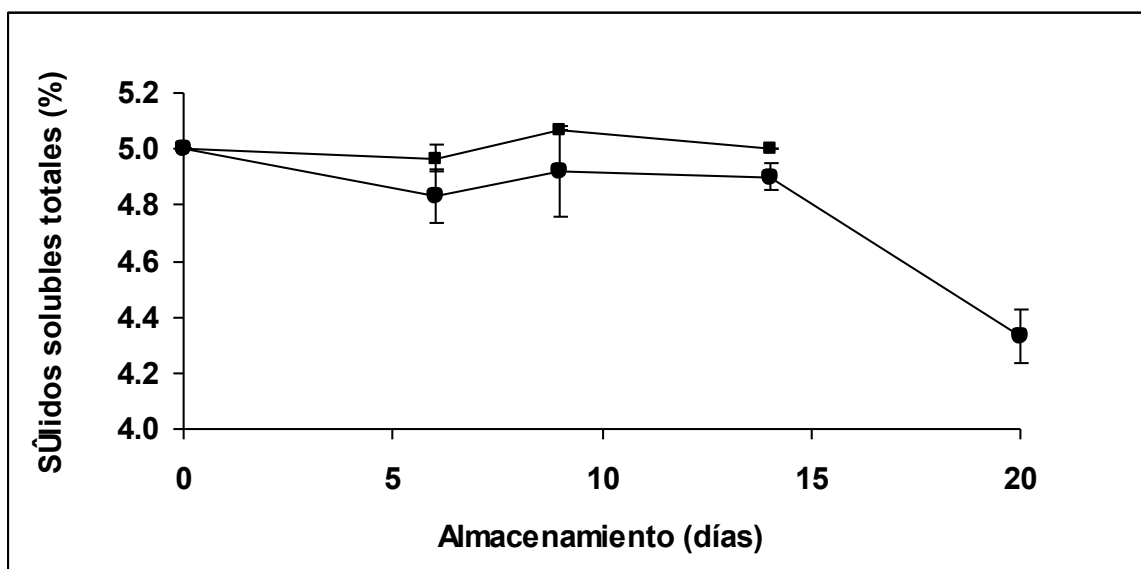


Fig. 19 Efecto de la temperatura en los sólidos solubles totales en jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

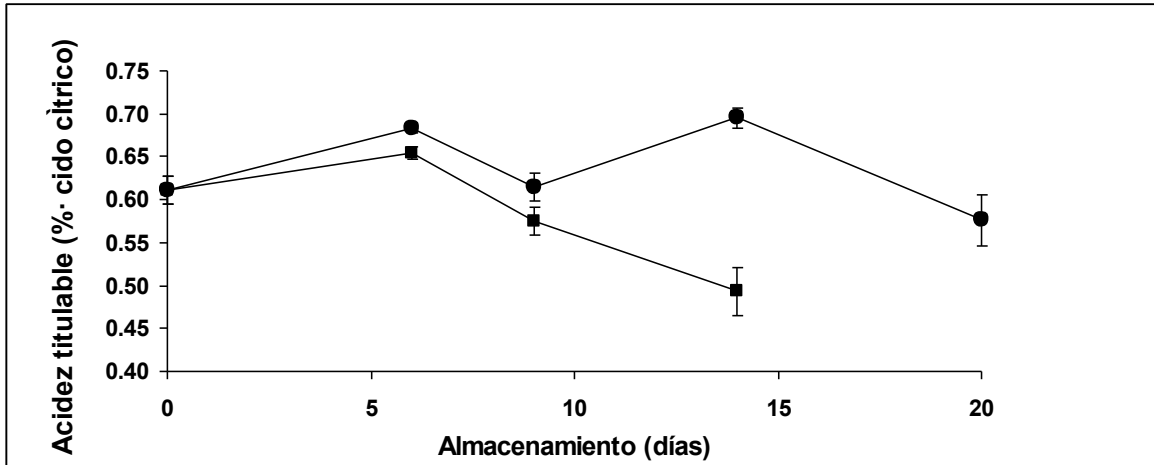


Fig. 20 Efecto de la temperatura en la acidez titulable en jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

La firmeza no se modificó en el jitomate almacenado en refrigeración comparada con la que mostraron los frutos frescos. En los frutos que se almacenaron a 20 °C la firmeza disminuyó significativamente a partir de los 9 días de almacenamiento (Fig. 21).

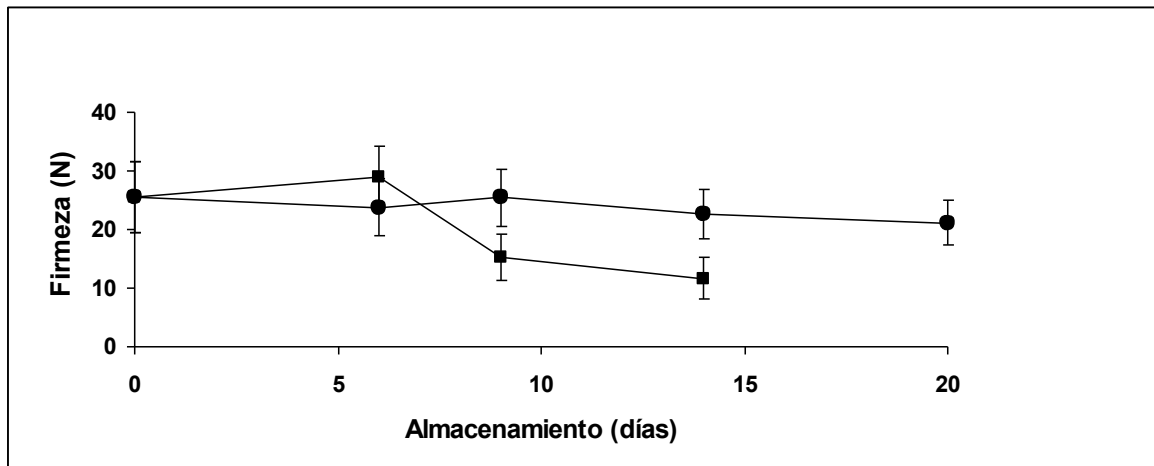


Fig. 21 Efecto de la temperatura en la firmeza de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

De los parámetros que definen el color, el C* fue el único que aumentó significativamente a partir del día 9 de almacenamiento en el jitomate refrigerado

con respecto a los valores que presentaban los frutos naranja recién cosechados. Los parámetros L^* y h no se modificaron durante todo el tiempo de almacenamiento en esta temperatura. En el jitomate almacenado a 20 °C, los tres parámetros del color disminuyeron rápidamente ($\alpha=0.05$) a partir del día 6 de almacenamiento, con respecto al jitomate del análisis inicial (Figs. 22, 23 y 24).

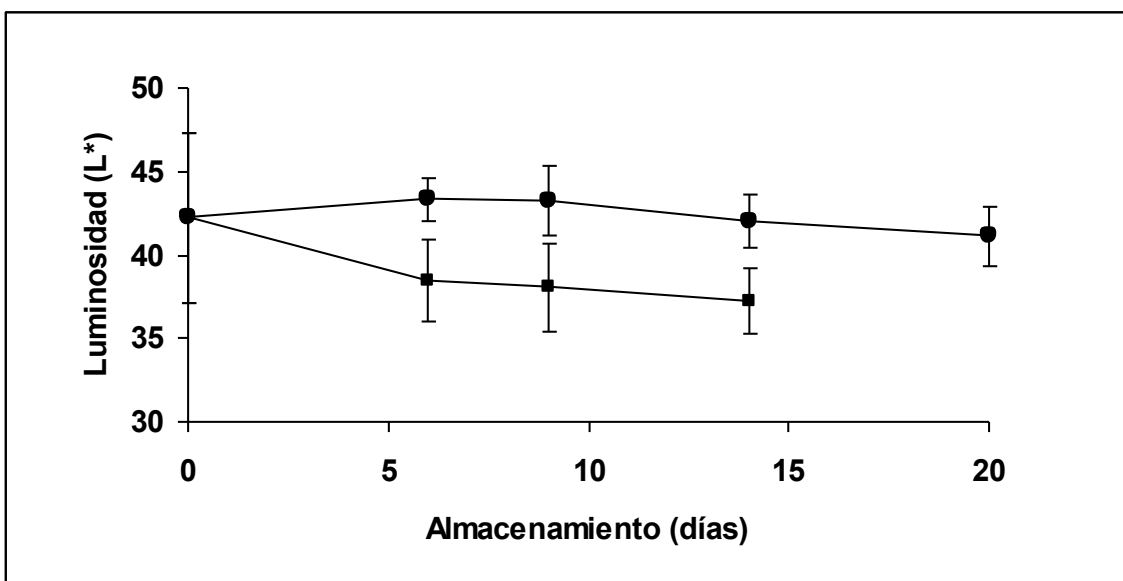


Fig. 22 Efecto de la temperatura en la luminosidad o claridad (L^*) de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

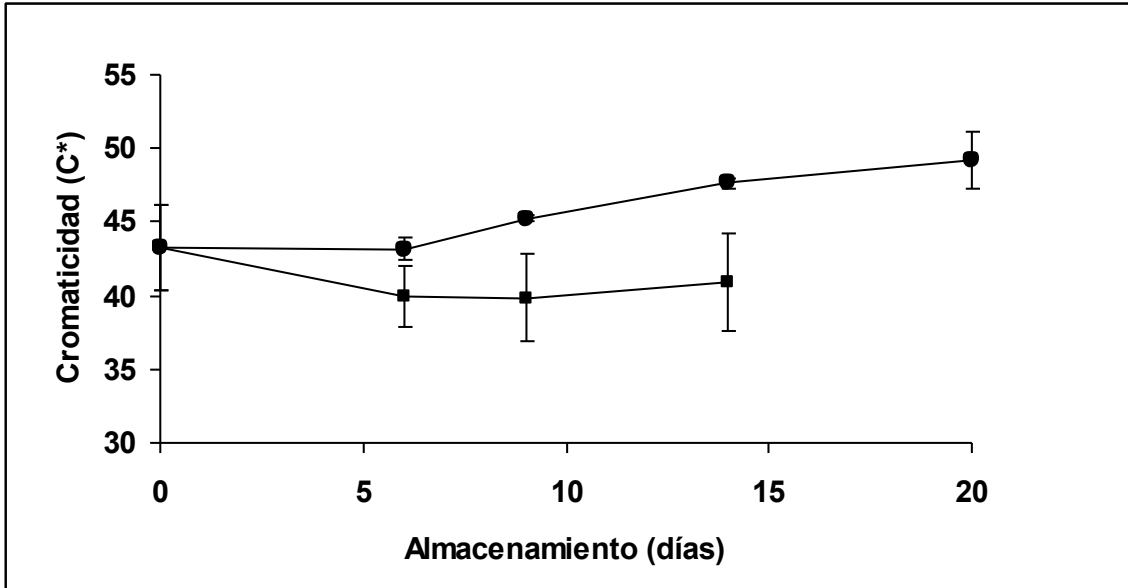


Fig. 23 Efecto de la temperatura en la cromaticidad o saturación(C*) de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

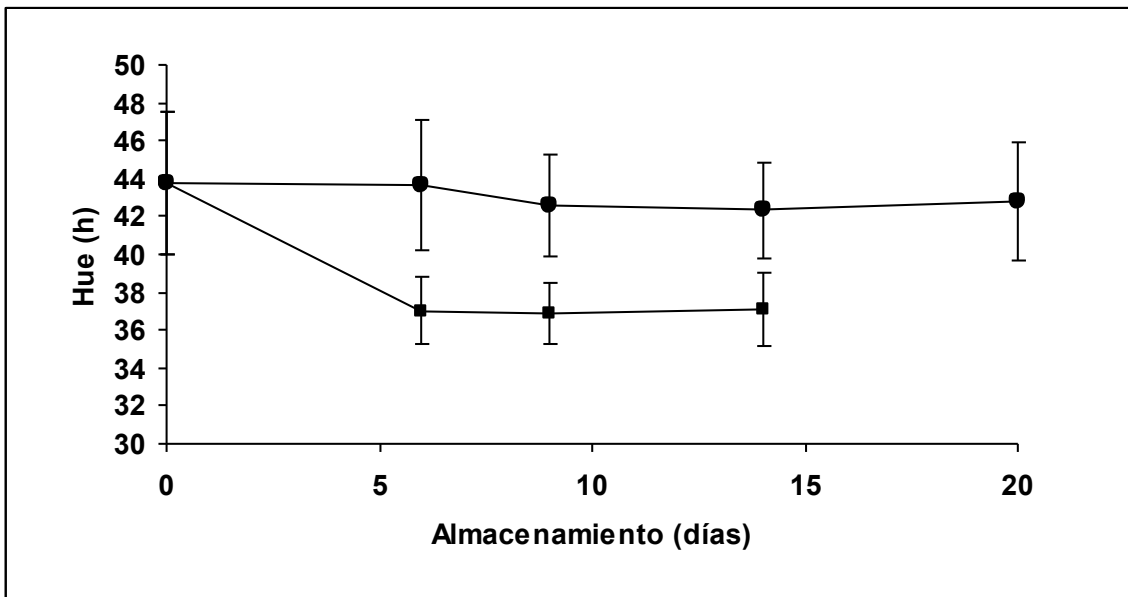


Fig. 24 Efecto de la temperatura en ángulo hue o matiz (h) de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

Los azúcares reductores no se modificaron durante todo el periodo que el jitomate estuvo almacenado a 20 °C respecto a los niveles que presentaron los frutos frescos. En contraste, en los frutos almacenados en refrigeración, los azúcares

reductores disminuyeron significativamente respecto al jitomate fresco a partir del día 9 de almacenamiento. Los valores de los azúcares reductores en jitomates almacenados en refrigeración siempre fueron más bajos que en los almacenados a 20 °C (Fig. 25). Lo anterior explica por qué la relación azúcar/ácido siempre fue mayor en los jitomates almacenados a 20 °C que en los que se almacenaron en refrigeración (Fig. 26).

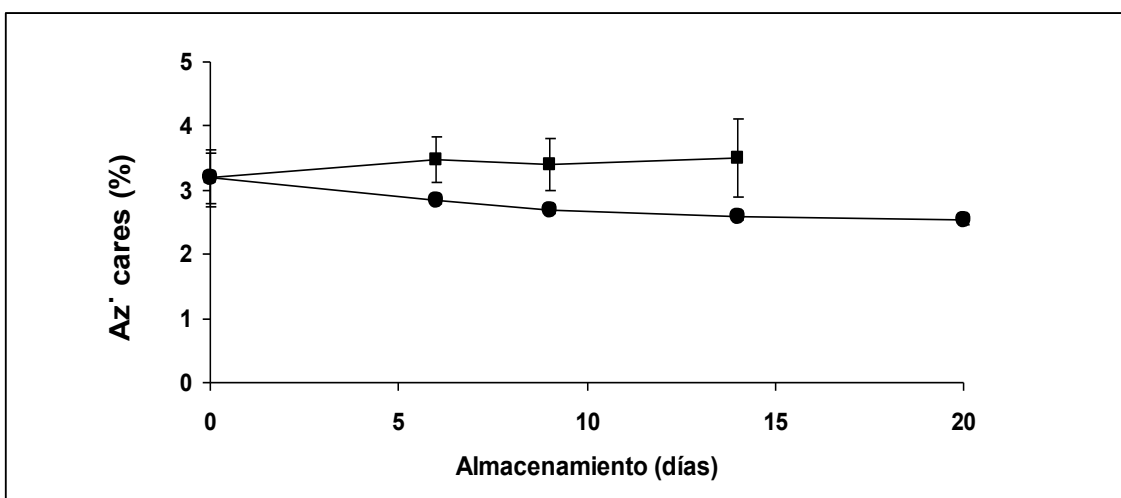


Fig. 25 Efecto de la temperatura en los azúcares reductores en jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

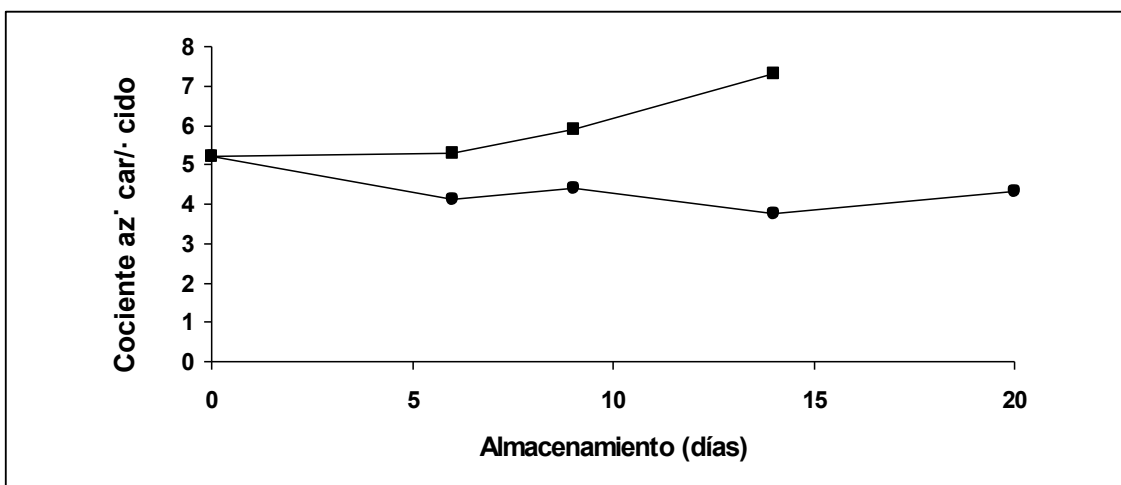


Fig. 26 Efecto de la temperatura en la relación azúcar/ácido en jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

6.2.3 Etileno y actividad respiratoria

La actividad respiratoria se mantuvo sin cambio en los jitomates almacenados a 20 °C respecto a la observada en el jitomate a los 0 días de almacenamiento. En el jitomate almacenado en refrigeración la actividad respiratoria fue ligeramente menor a la presentada por los frutos que se almacenaron a temperatura ambiente con una tendencia a ser inferior a la respiración del fruto fresco al final del periodo de almacenamiento (Fig. 27).

Los niveles de etileno tendieron a aumentar en los frutos almacenados a 20 °C con respecto a los niveles detectados en los frutos a los 0 días de almacenamiento. En el jitomate almacenado a 10 °C los niveles fueron siempre similares a los del jitomate antes de ser almacenado (Fig. 28).

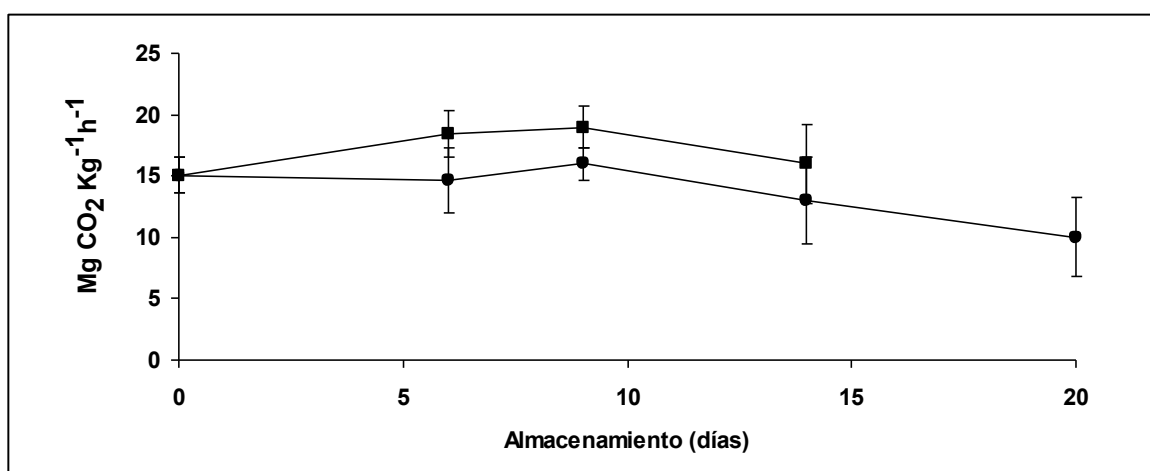


Fig. 27 Efecto de la temperatura en la actividad respiratoria de jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

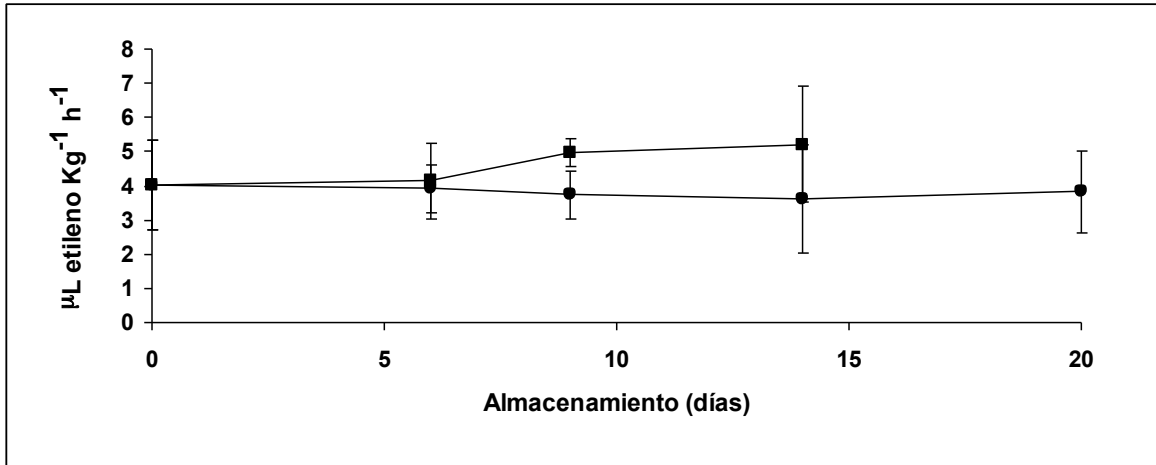


Fig. 28 Efecto de la temperatura en la producción de etileno en jitomate '7705' almacenado a 10 °C (●) y 20 °C (■).

6.2.4 Efecto de la temperatura en los compuestos volátiles del aroma

Los aromas que se analizaron en el jitomate '7705' provenían de diferentes vías metabólicas y precursores como lípidos (hexanal, hexanol, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, trans-3-hexenol y 2-isobutiltiazol), carotenoides (geranilacetona), aminoácidos (3-metilbutanol y 3-metilbutanal), ligninas (guayacol) y compuestos terpénicos (linalool) (Baldwin y col., 2000).

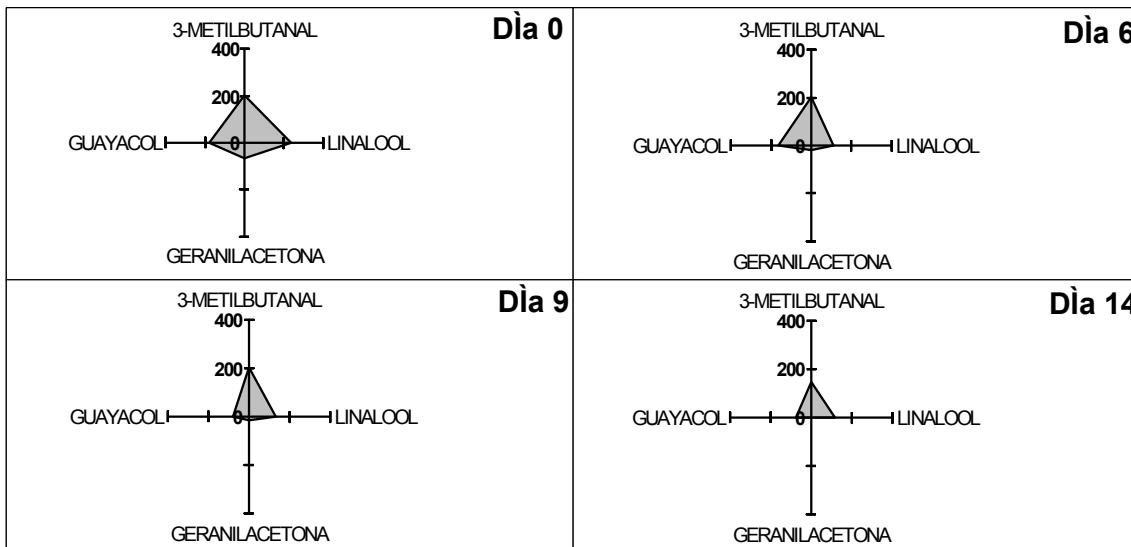


Fig. 29 Niveles de 3-metilbutanal, linalool, geranilacetona y guayacol del aroma de jitomate '7705' almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

Entre los compuestos derivados de lípidos los niveles de 2-isobutiltiazol y trans-3-hexenol no se modificaron cuando el jitomate se almacenó a 20 °C, en comparación con los niveles que presentaba el jitomate fresco (Figs. 30 y 33). El hexanal y el trans-2-hexenal aumentaron significativamente sus niveles desde el día 6 de almacenamiento, aunque el aumento del segundo de ellos fue transitorio regresando rápidamente a los niveles encontrados en los frutos frescos (Figs. 30 y 33). Por otra parte, el cis-3-hexenol y el hexanol disminuyeron significativamente sus niveles en el jitomate almacenado a 20 °C (Fig. 30).

En cuanto a los compuestos volátiles derivados de otras vías metabólicas todos disminuyeron significativamente con el almacenamiento. Sin embargo, en los frutos almacenados a 20 °C esta disminución ocurrió en diferentes días, así para los compuestos volátiles linalool, geranilacetona y 3-metilbutanol la disminución ocurrió a los 6 días de almacenamiento (Fig. 29 y 33) mientras que para el

guayacol y el 3-metilbutanal la disminución ocurrió más tarde, a los 9 y 14 días de almacenamiento, respectivamente (Fig. 29).

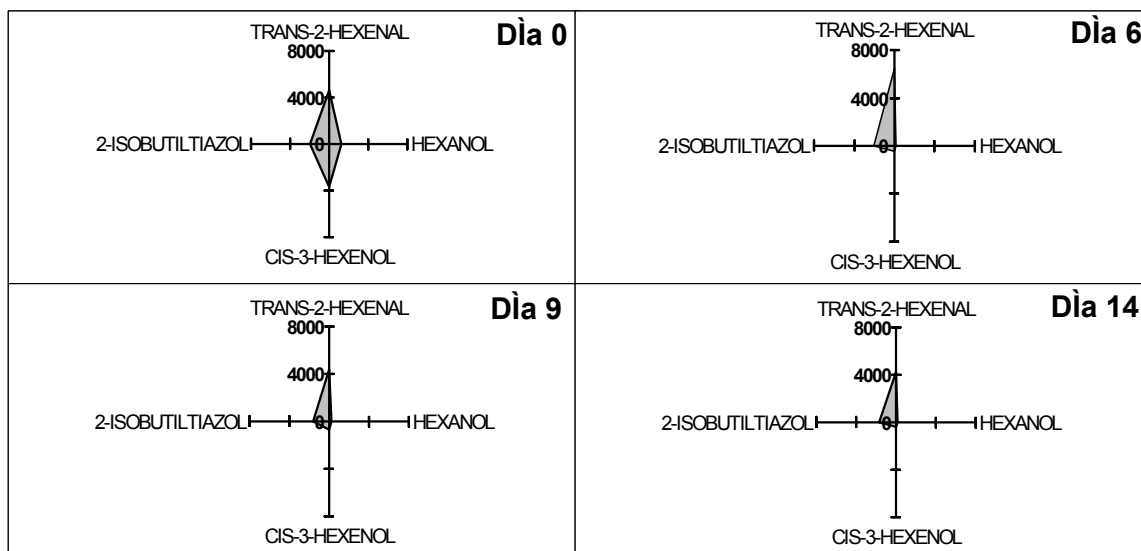


Fig. 30 Niveles de trans-2-hexenal, hexanol, cis-3-hexenol y 2-isobutiltiazol, del aroma de jitomate '7705' almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

En jitomates almacenados en refrigeración (10 °C), los niveles de cis-3-hexenol, y hexanol disminuyeron en forma significativa, mientras que los de 2-isobutiltiazol no se modificaron (Fig. 32). Este comportamiento fue similar a lo que ocurrió en el jitomate almacenado a 20 °C. La refrigeración también provocó un aumento significativo en los niveles de trans-3-hexenol a partir del día 14 de almacenamiento (Fig. 33), en contraste con lo observado en el jitomate almacenado a 20 °C, donde el nivel de este compuesto nunca se modificó.

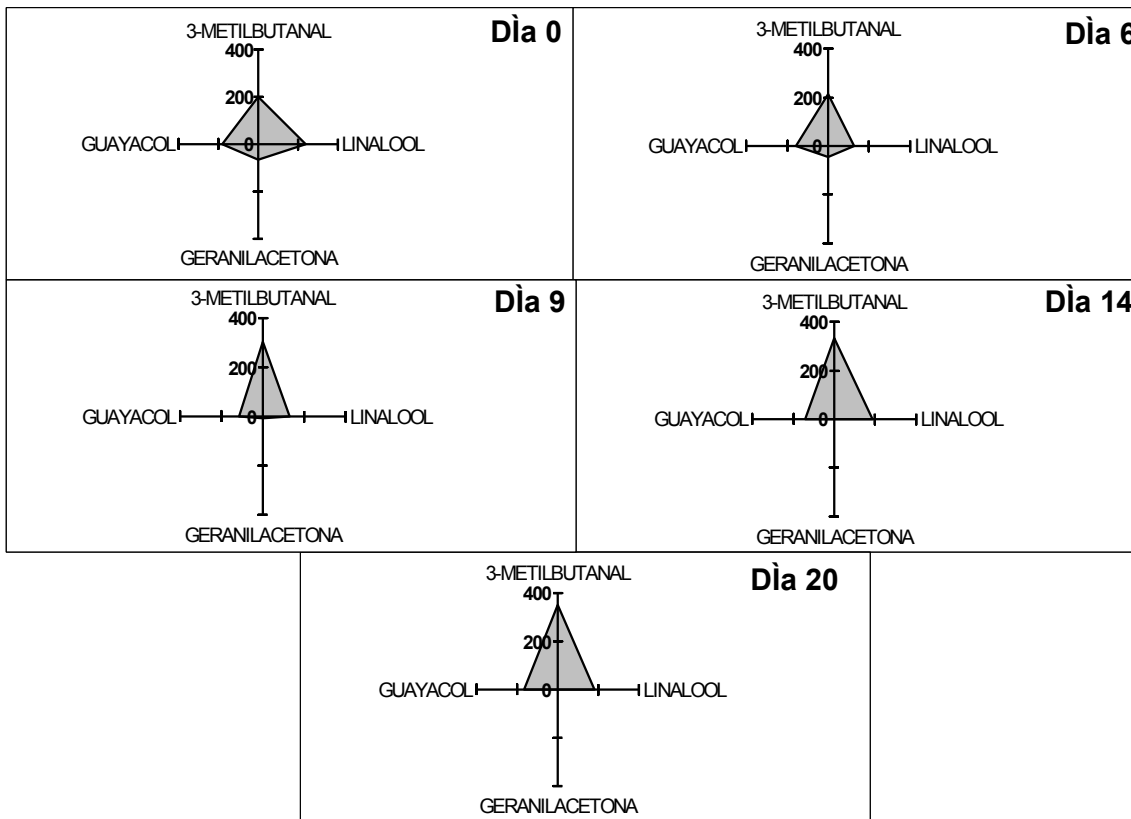


Fig. 31 Niveles de 3-metilbutanal, linalool, geranilacetona y guayacol del aroma de jitomate '7705' almacenado a 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

El trans-2-hexenal incrementó significativamente sus niveles y el hexanal no presentó cambio en los mismos por efecto de la refrigeración del jitomate (Figs. 32 y 33) lo cual demuestra que la baja temperatura afecta el metabolismo de estos compuestos volátiles (que a 20 °C presentaron comportamiento diferente).

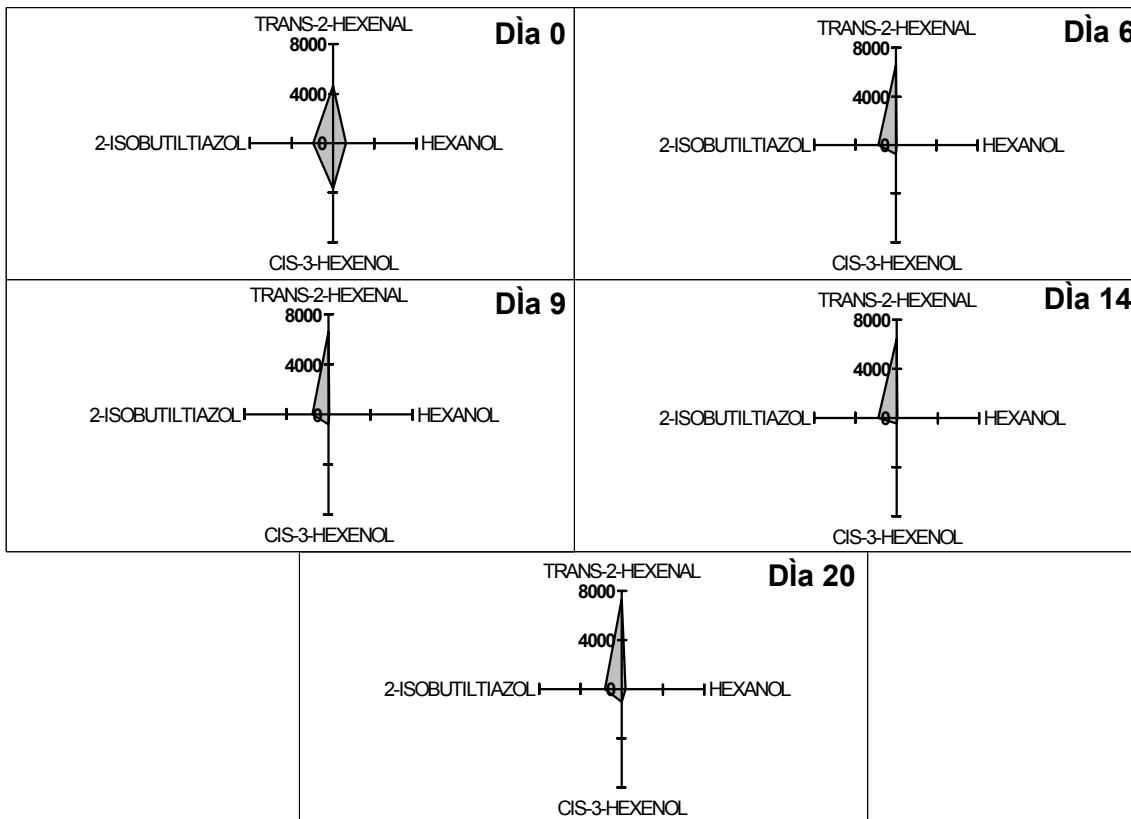


Fig. 32 Niveles de trans-2-hexenal, hexanol, cis-3-hexenol y 2-isobutiltiazol del aroma de jitomate '7705' almacenado a 10 °C por diferentes periodos. Los valores son unidades de área divididas entre 100.

La refrigeración provocó un aumento significativo del 3-metilbutanal a partir del día 9 de almacenamiento, lo cual contrasta con los resultados obtenidos con los frutos almacenados a 20 °C (donde sus niveles presentaban una disminución significativa en el día 14 de almacenamiento).

La disminución significativa de los compuestos volátiles linalool, geranilacetona y 3-metilbutanol en el jitomate almacenado a 10 °C fue similar a la que presentaron los jitomates que se almacenaron a 20 °C (Figs. 31 y 33), aunque el cambio observado en los niveles del 3-metilbutanol fue más lento en el jitomate en refrigeración. Por último, los niveles de guayacol no se modificaron por efecto de

la refrigeración, lo cual contrasta con la disminución que se observa cuando el jitomate se almacena a 20 °C.

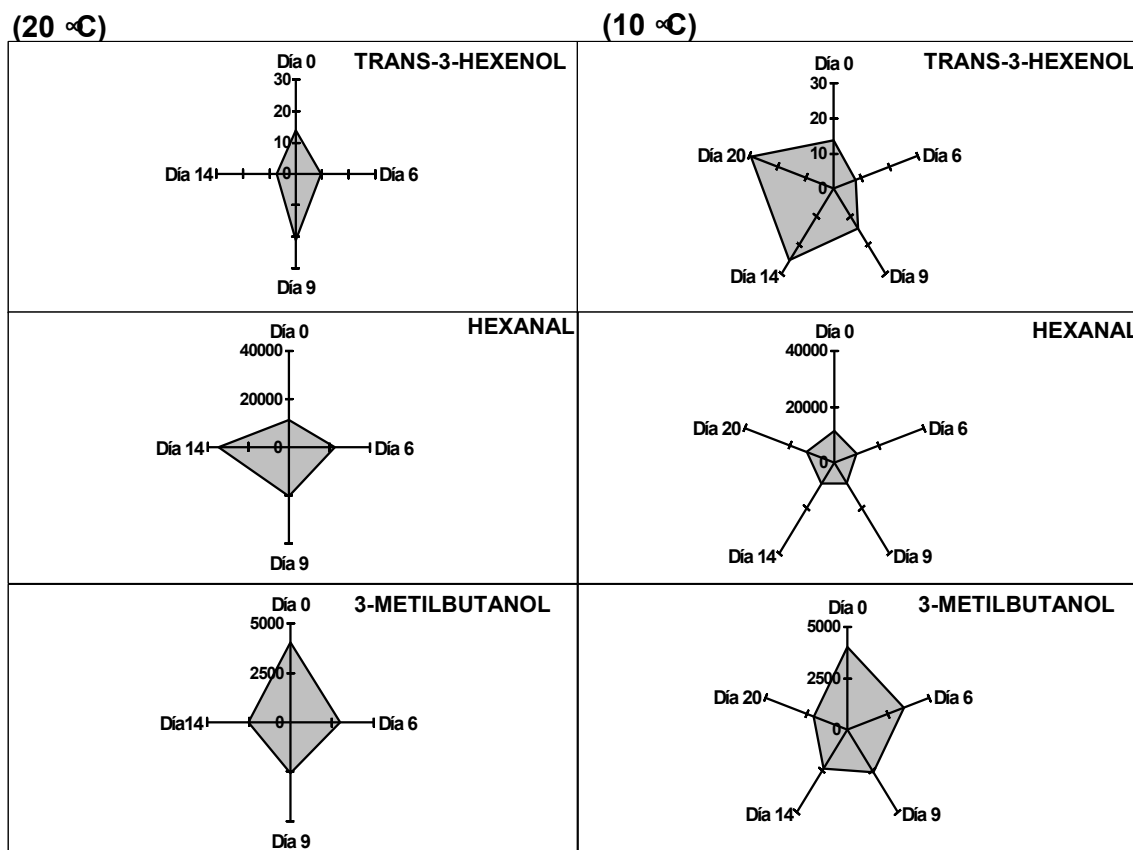


Fig. 33 Niveles de trans-3-hexenol, hexanal, 3-metilbutanol del aroma de jitomate '7705' almacenado a por diferentes periodos a 20 °C y 10 °C Los valores son unidades de área divididas entre 100.

6.2.5 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima ADH

Los cambios que presentan algunos compuestos volátiles, como el trans-3-hexenol, 3-metilbutanal, hexanal, 3-metilbutanol y guayacol por efecto de la refrigeración, pueden ser explicados por cambios en la actividad de alguna(s) enzima(s) que participe(n) en su metabolismo. Como puede observarse la mayoría de los compuestos que presentan cambios durante el almacenamiento refrigerado

son aldehídos o alcoholes (trans-3-hexenol, 3-metilbutanal, hexanal y 3-metilbutanol) provenientes de lípidos o de aminoácidos. En la interconversión de dichos compuestos participa la enzima ADH. Durante el almacenamiento refrigerado de los jitomates se observó un aumento en el cociente aldehído/alcohol para los pares 3-metilbutanal/3metilbutanol y hexanal/hexanol (cuadro 2).

Cuadro 2

Cocientes relativos de aldehidos/alcoholes en jitomate almacenado a 10 °C

Almacenamiento (días)	Cociente 3-metilbutanal/3metilbutanol	Cociente hexanal/hexanol
0	1.00	1.00
6	1.33	10.68
9	2.45	11.57
14	2.90	12.37

Valores del cociente al día 0 de almacenamiento se consideraron como 1

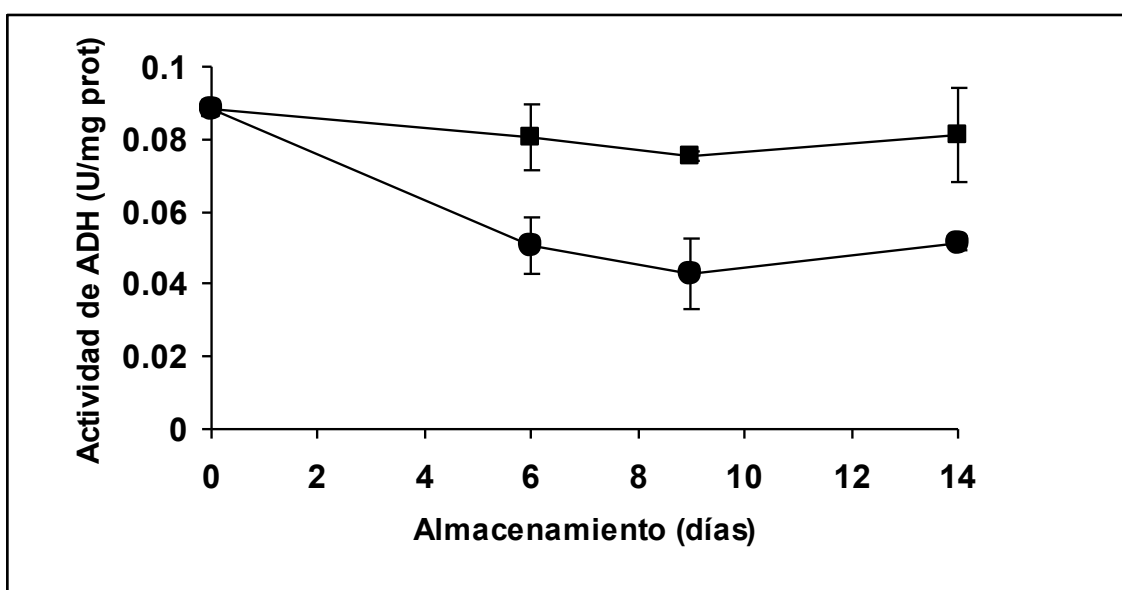


Fig. 34 Actividad de ADH de jitomate '7705' almacenado 10 °C (●) y 20 °C (■).

La actividad de la enzima ADH en jitomate almacenado a 20 °C fue similar a la que presentó el jitomate a los 0 días de almacenamiento. En el jitomate que fue almacenado en refrigeración, la actividad de esta enzima disminuyó respecto a la del jitomate fresco y a la del almacenado a 20 °C (Fig. 34). La disminución en la actividad de esta enzima en los jitomates refrigerados es consistente con el aumento en el cociente aldehído/alcohol observado.

6.2.6 Efecto de la temperatura en la expresión del gen que codifica para la enzima ADH2

En la figura 35 se presentan los resultados de la densitometría de PCR de tres experimentos realizados a distintos tiempos de almacenamiento en refrigeración. Estos resultados preliminares, de la expresión del gen que codifica para la enzima ADH2 no mostraron reproducibilidad. Entre los problemas detectados se pueden mencionar el bajo rendimiento de ARN que se obtuvo con la técnica de extracción de Trizol, la presencia de contaminación con ADN y la sonda de normalización utilizada, ya que el nivel de expresión de la actina fue muy contrastante con el del gen estudiado. Por ello, se está implementando otra metodología de extracción de ARN, propuesta por Chang y colaboradores 1993. Asimismo, se cambió el gen de normalización y se está probando una técnica de RT-PCR semicuantitativo utilizando el Kit Quantum RNA TM 18S Internal Standards (Catalogo # AM1716, AM1717, AM1718 de Ambion).

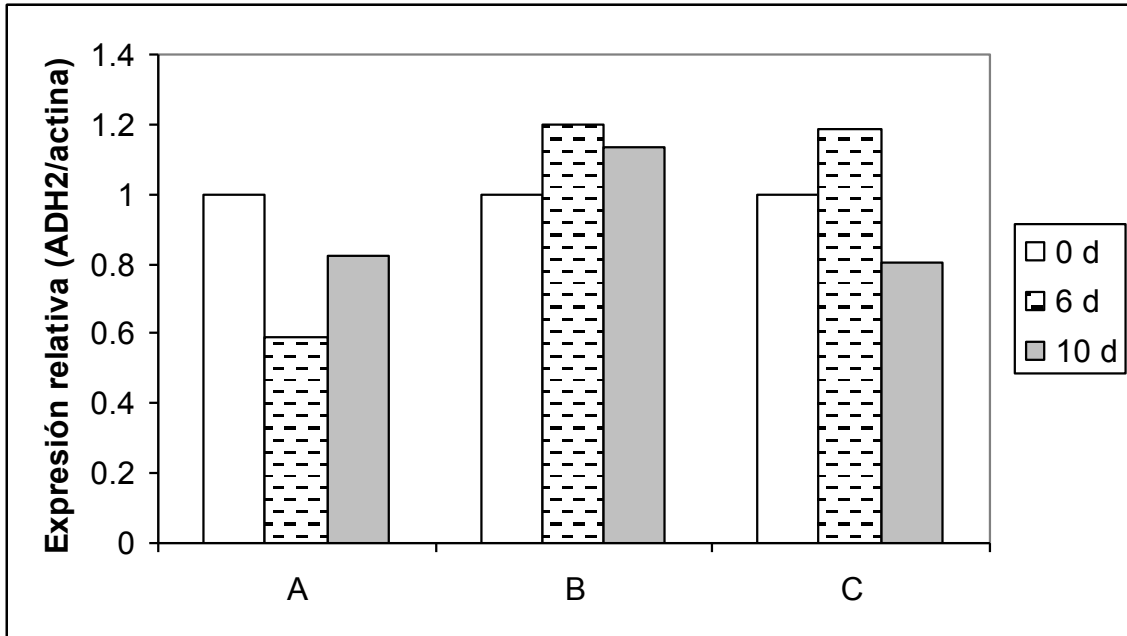


Fig. 35 Expresión relativa del gen que codifica para la enzima ADH2 en jitomate almacenado en refrigeración en tres experimentos distintos.

6.2.7 Efecto de la temperatura en el aroma evaluado sensorialmente

El cambio en los compuestos volátiles cuando el jitomate se almacena en refrigeración puede ser percibido por un panel de jueces entrenados como un cambio en el aroma de jitomate, pudiéndose realizar la evaluación del aroma en jitomate completo, partido o degustado. La evaluación sensorial del jitomate '7705' se efectuó en los 3 tipos de muestras, ofreciendo cada una ventajas y desventajas. Cuando la evaluación se hace en jitomate completo se detectan sólo compuestos primarios del aroma, es decir los que se generan en tejido intacto y con niveles tan bajos que son difíciles de detectar y evaluar por los jueces. Cuando la evaluación se hace en jitomate partido, se detectan tanto compuestos volátiles primarios como secundarios (éstos últimos generados cuando hay ruptura de tejidos y cuyos niveles pueden ser mayores o menores dependiendo de la

rapidez con que se realice la evaluación). Asimismo, la intensidad de los descriptores se incrementa en muestras partidas y por ello es más fácil la evaluación para los jueces. Por último, cuando la evaluación se realiza degustando los frutos, se detectan aromas primarios y secundarios en concentraciones adecuadas para su evaluación, sin embargo la evaluación es más compleja ya que en ella interviene no sólo el olfato sino también el gusto. Durante el análisis de correlación entre los componentes del aroma y la evaluación de los jueces se encontró que había mayor número de correlaciones, y más altas, entre la evaluación hecha con jitomate partido y la evaluación química del aroma. Por ello, se muestran sólo los resultados de la evaluación sensorial hecha en jitomate partido.

Los jueces entrenados no detectaron cambios ($\alpha=0.05$) en los descriptores, medicinal, cítricos, humedad solvente, aceite de almendras, floral vegetal, manzana verde, herbáceo, jitomate verde y avinagrado del aroma de jitomate almacenado a 20 °C en comparación con los jitomates del análisis inicial. Los valores son la intensidad del descriptor (longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada) (Figs. 36, 37 y 40).

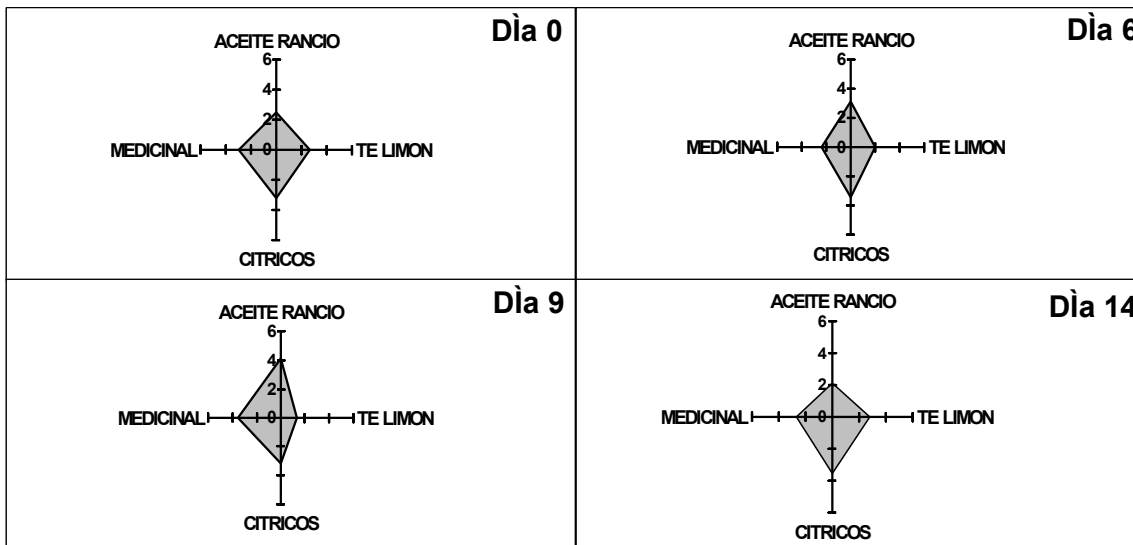


Fig. 36 Niveles de los descriptores aceite rancio, té limón, cítricos y medicinal del aroma de jitomate almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada.

Los únicos descriptores que se modificaron significativamente ($\alpha=0.05$) de manera transitoria a los 9 días de almacenamiento fueron aceite rancio (incremento) y té limón respectivamente. Posteriormente, estos descriptores retornaron a los niveles que tenían en el jitomate de 0 días de almacenamiento (Fig. 36).

Por su parte, de acuerdo a los jueces, los jitomates almacenados en refrigeración presentaron una disminución y un aumento significativos ($\alpha=0.05$) en los descriptores té limón y humedad solvente a partir de los 9 y 6 días de almacenamiento respectivamente, comparados con los niveles del jitomate a los 0 días de almacenamiento (Figs. 38 y 40). Asimismo, los jueces también detectaron un incremento y una disminución transitorios a los 6 y 20 días de almacenamiento en los descriptores medicinal y aceites de almendras respectivamente (Figs. 38 y 39). Los otros descriptores no se modificaron en sus niveles en los frutos

almacenados a esta temperatura comparados con el jitomate del análisis inicial (Figs. 38, 39 y 40).

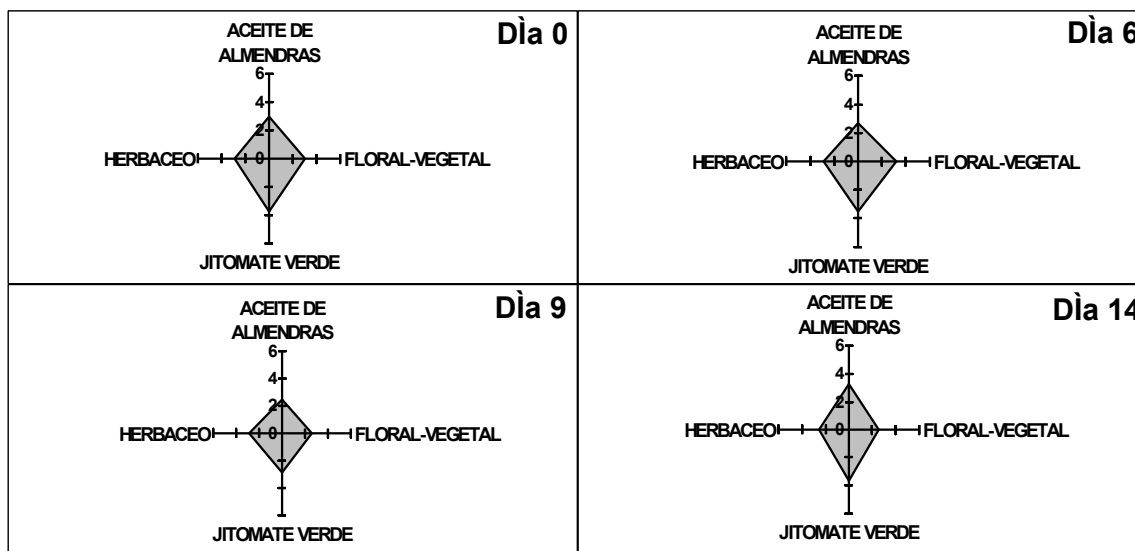


Fig. 37 Niveles de los descriptores aceite de almendras, floral-vegetal, jitomate verde y herbáceo del aroma de jitomate almacenado a 20 °C durante diferentes periodos. Los valores son longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada.

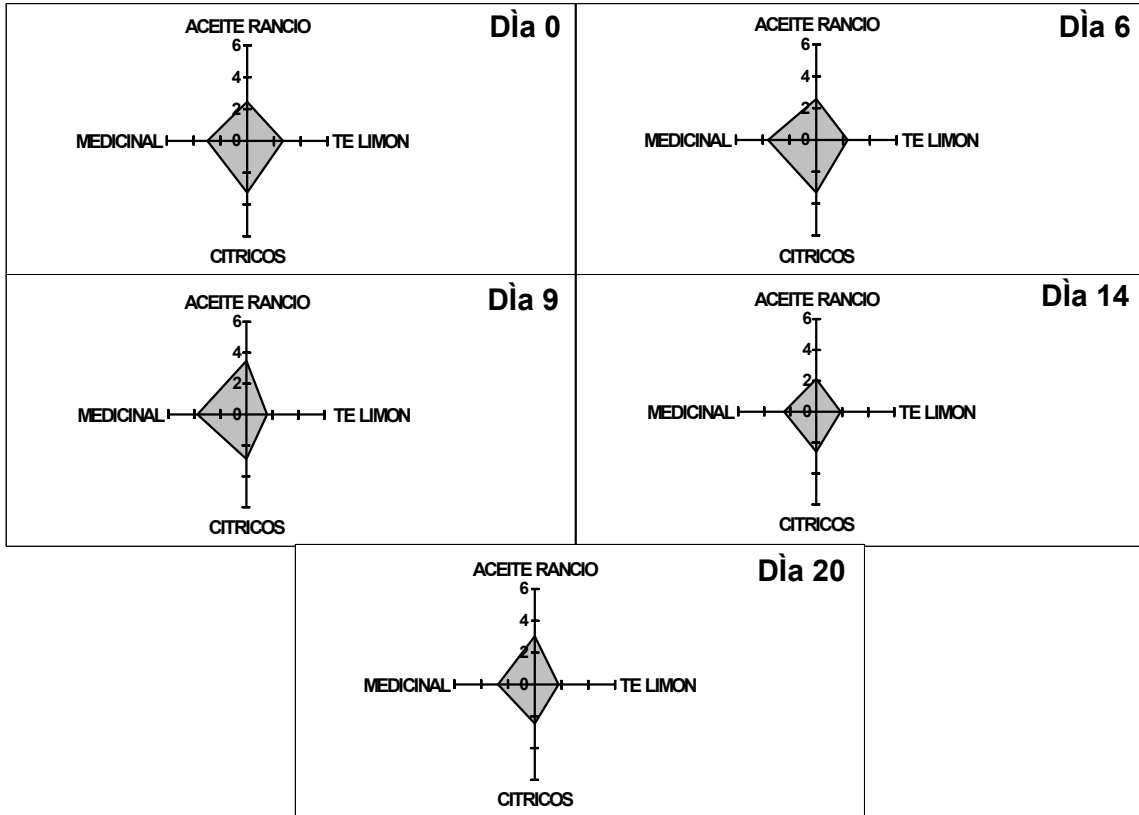


Fig. 38 Niveles de los descriptores aceite rancio, té limón, cítricos y medicinal del aroma de jitomate almacenado a 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada.

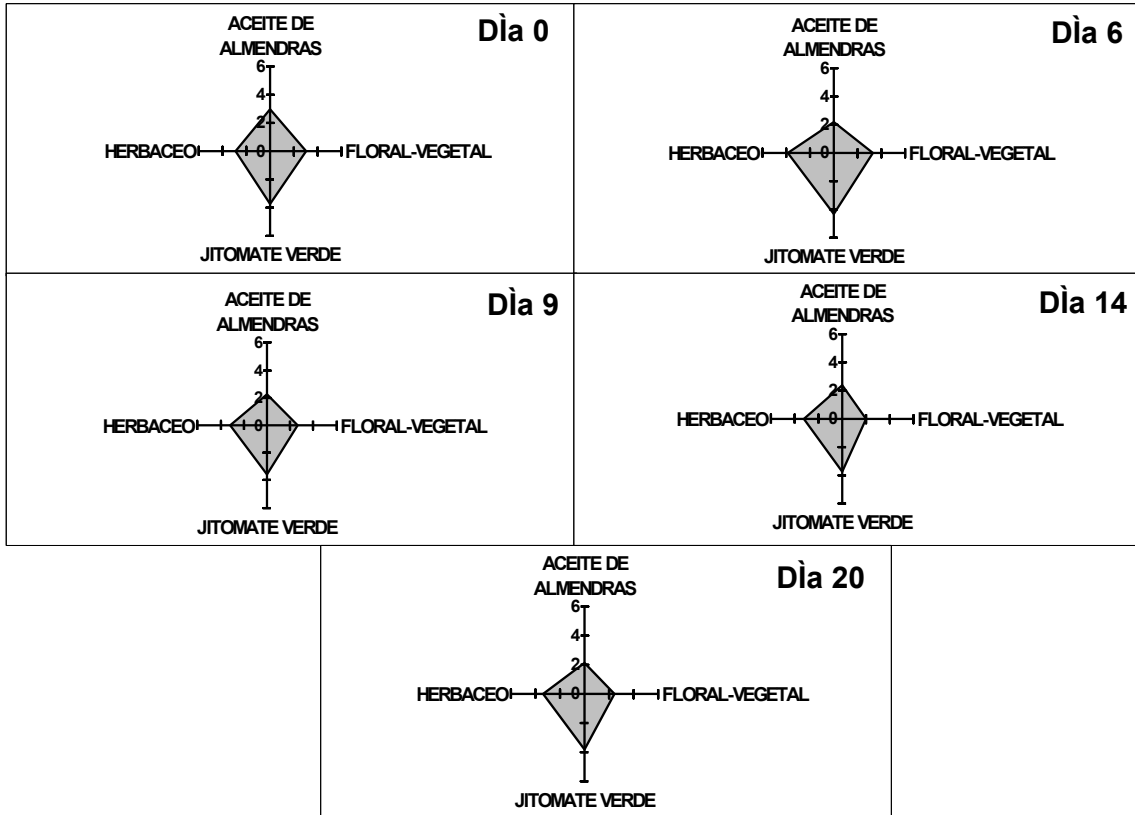


Fig. 39 Niveles de los descriptores aceite de almendras, floral-vegetal, jitomate verde y herbáceo del aroma de jitomate almacenado a 10 °C durante diferentes periodos. Los valores son longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada.

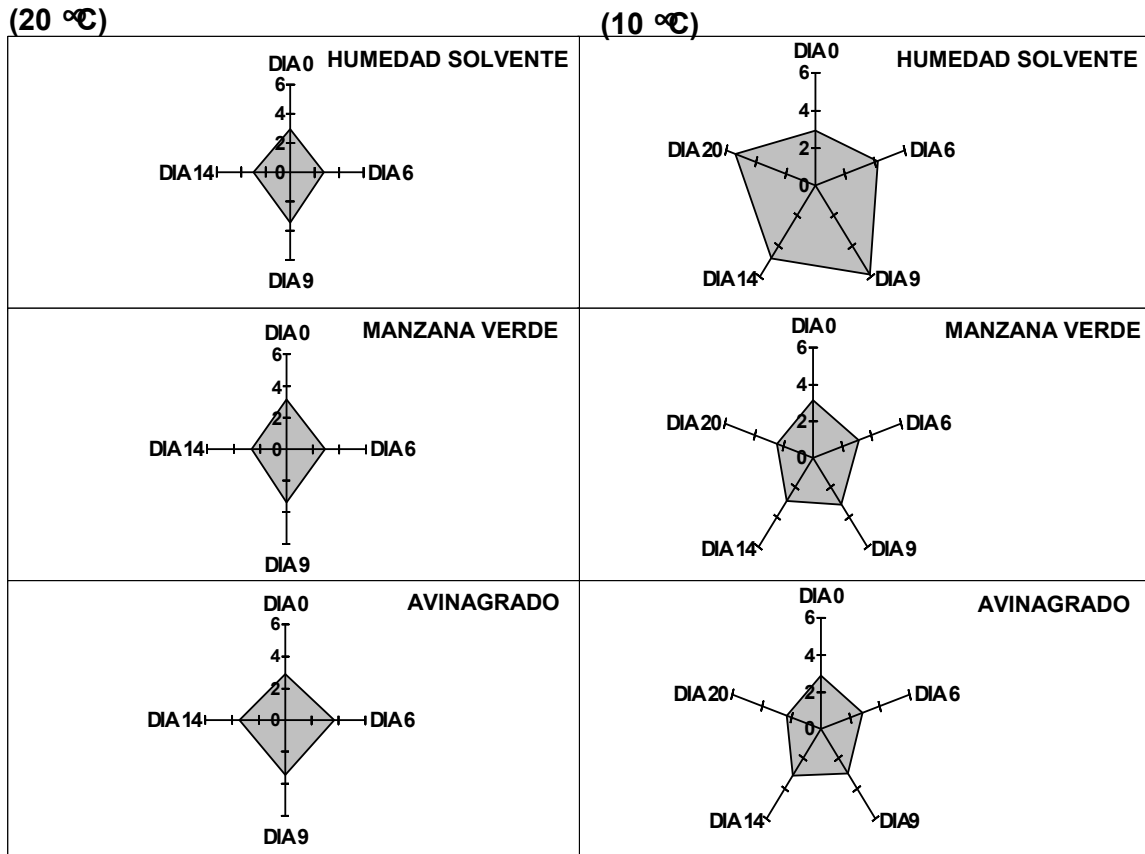


Fig. 40 Niveles de los descriptores, humedad solvente, manzana verde y avinagrado del aroma de jitomate almacenado durante diferentes periodos a 20 °C y 10 °C. Los valores son longitud en cm marcados por los jueces sobre una escala no estructurada.

7 DISCUSION

En años recientes, la calidad del jitomate, en particular en lo referente a sus características sensoriales, ha sido fuertemente cuestionada por los consumidores. La disminución en la calidad sensorial se ha atribuido en parte a cambios en los niveles de los compuestos volátiles del aroma. En el presente trabajo, se observó que en general, los parámetros de calidad AT, SST, textura y color del jitomate '7705' almacenado a 10 °C no se modificaron significativamente con respecto al análisis inicial. Por otro lado, la relación azúcar/ácido disminuyó a partir del día 6 de almacenamiento a esta temperatura, en concordancia con lo reportado previamente por Kader y colaboradores (1978). Este cociente es determinante en el sabor del jitomate. Los resultados encontrados en este trabajo sobre el efecto del almacenamiento a 10 °C en los parámetros de calidad AT y SST de la variedad 7705 no son consistentes con los encontrados por Maul y colaboradores (2000), en los cultivares BHN-189 y Solimar, apoyando la idea de que la susceptibilidad a la baja temperatura es dependiente del cultivar.

Por su parte, el perfil químico del aroma cambió a partir del día 6 de almacenamiento principalmente en los jitomates almacenados en refrigeración.

Se ha reportado que pequeños cambios en los niveles de los compuestos volátiles de jitomate, pueden afectar el aroma y por consiguiente el sabor de los frutos (Maul y col., 2000; Tandon y col., 2003; Baldwin y col., 2004). La refrigeración provocó que en los jitomates almacenados a esta temperatura, el metabolismo de los volátiles trans-3-hexenol, trans-2-hexenal, hexanal, 3 metilbutanal y guayacol fuera diferente al de los jitomates almacenados a 20 °C, lo cual se reflejó en la

manera tan contrastante en que iban cambiando los niveles de estos volátiles en el jitomate almacenado en estas dos temperaturas. Las modificaciones observadas se reflejaron en un aumento en la relación aldehído/alcohol en los pares hexanal/hexanol y 3-metilbutanal/3-metilbutanol en el jitomate almacenado a 10 °C, que puede ser explicada por la disminución encontrada en la actividad de la enzima ADH. Speirs y colaboradores (1998), reportaron un aumento en la relación aldehído/alcohol en plantas de jitomate transformadas que mostraban una baja actividad de ADH2. La disminución en la actividad de esta enzima a bajas temperaturas puede deberse a una regulación transcripcional por una reducción en la expresión del gen *adh2* (lo cual se detectaría como una disminución en los niveles de los transcritos). Otra posible explicación, si no hubiera cambio en la expresión y los niveles de ARNm de esta enzima se mantuvieran constantes durante el almacenamiento refrigerado de los frutos, es la existencia de una posible regulación posttranscripcional, ya sea a nivel traduccional o postraduccional. Christie y colaboradores (1991), reportaron que en plántulas de maíz y de arroz la baja temperatura aumenta la actividad de ADH1 así como los niveles de los transcritos del gen *adh1*. Se ha descrito que la ADH2 de jitomate es inducida a nivel transcripcional por estrés debido a bajos niveles de oxígeno, pero no se ha detectado que sea inducida por etileno (Zhu y col., 2005). Longhurst y colaboradores (1990 y 1994), y Speirs y colaboradores (2002), sugirieron que la inducción a nivel transcripcional del gen *adh2* durante la maduración del jitomate y el consecuente incremento en la actividad de la enzima ADH2 es un efecto secundario de la maduración, asociado con el ablandamiento del fruto y su efecto en la disminución de oxígeno interno y/o en la acidez del citoplasma. En este

sentido, una variedad con más firmeza tendrá menos actividad de ADH2 que una variedad menos firme y esto tendrá un efecto sobre el sabor de los frutos. En este trabajo se observó una menor actividad de ADH2 en los jitomates refrigerados que presentaron mayor firmeza.

La alteración de los volátiles que proceden de ácidos grasos (trans-3-hexenol, trans-2-hexenal, hexanal) en jitomates refrigerados puede deberse a una reducción en la disponibilidad de sus precursores y/o a la modificación de los sistemas enzimáticos (Whitaker, 1993). Otra explicación para la reducción de los volátiles, es que las bajas temperaturas pueden causar daños a la estructura de las mitocondrias y consecuentemente al proceso respiratorio, lo cual limita la producción de energía y las reacciones metabólicas que demandan esta energía (Buescher, 1975, Todd y col., 1992; Whitaker, 1993; Boukobza y Taylor, 2002). La disminución en la actividad de ADH2 observada en este trabajo en los frutos refrigerados, es consistente con la propuesta de Whitaker de que la refrigeración modifica la actividad de algunas enzimas.

La evaluación sensorial cuantitativa mediante descriptores realizada por un panel de jueces entrenados se correlacionó con los cambios observados en el perfil químico de los jitomates almacenados a ambas temperaturas. Se consideraron correlaciones significativas aquellas con un P value < 0.1, de acuerdo a una prueba t, en forma similar a lo reportado en estudios previos (Maul y col., 2000). Como se mencionó anteriormente, en el jitomate almacenado a 20 °C aumentaron significativamente los niveles de hexanal y trans-2-hexenal y disminuyeron los de cis-3-hexenol, hexanol, linalool, geranilacetona, 3-metilbutanol, guayacol y 3-metilbutanal respecto al análisis inicial. Los cambios en estos volátiles fueron

percibidos por los jueces como un incremento del descriptor aceite rancio y como una disminución del descriptor té limón en el jitomate almacenado a esta temperatura. Se encontró que el descriptor aceite rancio tenía una baja correlación con los cambios de 3-metilbutanal, al cual los jueces le habían asignado dicho descriptor, también se encontró una baja correlación de este descriptor con los otros volátiles que se modificaron. En relación al descriptor té limón, se encontró que aunque su correlación con su volátil asociado linalool fue también baja ($r=0.37$) su decremento fue posterior (9 días) a la disminución observada en los niveles de linalool (6 días).

Como se mencionó previamente, el jitomate refrigerado mostró respecto al análisis inicial, un aumento significativo en los niveles de los volátiles 3 metilbutanal, trans-2-hexenal y trans-3-hexenol; mientras que los niveles de hexanal y guayacol no se modificaron por efecto de la refrigeración. Estas alteraciones en el perfil químico que ocurrieron a partir de los 6-9 días de almacenamiento, fueron percibidas sensorialmente por el panel de jueces entrenados. Los jueces detectaron modificaciones en un mayor número de descriptores en el jitomate refrigerado con respecto al jitomate fresco, que las que reportaron para el jitomate almacenado a 20 °C. El incremento en el descriptor humedad solvente presentó una alta correlación positiva con trans-3-hexenol ($r=0.83$), mientras que la disminución en el descriptor aceite de almendras presentó una alta correlación negativa con trans-2-hexenal ($r=-0.97$). Estos fueron los únicos casos en los que se encontró una correlación directa o inversa entre el descriptor y el volátil al cual los jueces le habían asignado dicho descriptor. En relación al descriptor medicinal, el cual no correlacionó con el cambio en los niveles de su volátil asociado (guayacol), si

presentó una alta correlación con el cambio en los niveles de trans-3-hexenol ($r = -0.78$). Resulta interesante que aunque el trans-3-hexenol no se menciona en la literatura como un compuesto de impacto del aroma de jitomate, en este estudio se encontró que sus niveles se incrementaron en refrigeración y este cambio tuvo una buena correlación con el cambio en varios descriptores del aroma como el medicinal y el humedad solvente. Debido a ello, se sugiere que este volátil pudiera servir como un indicador del efecto de la baja temperatura en la variación del aroma del jitomate '7705'.

Por su parte, el decremento en el descriptor té limón mostró una baja correlación con la disminución observada en los niveles de linalool en los jitomates almacenados en refrigeración. Sin embargo, la modificación en este descriptor mostró altas correlaciones con los cambios en otros volátiles, por ejemplo, se encontraron correlaciones positivas con la variación en los niveles de 3-metilbutanol ($r = 0.93$) y geranilacetona ($r = 0.95$) y negativas con los niveles de 3-metilbutanal ($r = -0.89$).

Para tratar de explicar la ausencia de correlaciones directas entre los cambios en los volátiles del aroma y de sus descriptores asociados, se debe considerar que los jueces hicieron la asignación consensuada de los descriptores con base en estándares de volátiles puros diluidos en agua. En el aroma de jitomate hay una mezcla de 400 volátiles que pueden estar matizando o alterando los aromas individuales, así que la alteración de uno o varios descriptores detectada por los jueces en el aroma del jitomate pudo deberse a la modificación de uno o varios volátiles, dentro de los cuales puede estar o no incluido el compuesto al que individualmente los jueces le asignaron dicho descriptor. De acuerdo con Lawless

y Malone (1986), Tandon y colaboradores (2003), Bezman y colaboradores (2003) y Baldwin y colaboradores (2004), la percepción de los compuestos individuales del aroma no refleja la interacción que ocurre entre ellos, cuando éstos se perciben en conjunto durante el consumo de un jitomate fresco o bien cuando se encuentran disueltos en una matriz compleja. En este sentido, también se debe considerar que la percepción sensorial del aroma se afecta por el sentido del gusto.

Se ha reportado que la percepción del aroma puede modificarse por la manera en que se presentan las muestras a los jueces durante la evaluación sensorial, ya que si éstas se homogeneizan, se puede alterar el aroma al cambiar la estructura original del tejido, debido al rompimiento de la piel y las semillas, lo cual no ocurre durante el proceso de masticación normal (Speirs y col., 1998; Prestage y col., 1999). En el presente trabajo los resultados sensoriales se obtuvieron evaluando jitomate fresco entero o partido pero no homogeneizado, para tratar de que los resultados, fueran más representativos de las condiciones habituales de consumo. Tandon y colaboradores (2000), han propuesto que un incremento en los compuestos volátiles responsables de las notas florales (6-metil-5-hepten-2-ona y beta-ionona), frutales (cis-3-hexenal y geranilacetona) y frescas (3-metilbutanol y 1-penten-3-ona) del aroma de jitomate, junto con una reducción en los compuestos responsables de las notas a rancio (hexanal, trans-2hexenal y 3-metilbutanal) y agrio (2-isobutiltiazol) mejorarían el sabor del jitomate. Por su parte, Gray y colaboradores (1999), recomiendan un incremento en el nivel de los aldehidos C₆. para mejorar el sabor del jitomate. Sin embargo, ambos autores reconocen que es importante la participación de los consumidores a los que va

destinado el producto, para determinar que recomendación es mejor para aumentar la aceptabilidad del jitomate. En este trabajo se encontró que en el jitomate '7705' cosechado en México los niveles de 3-metilbutanol se redujeron mientras que los de trans-2-hexenal y trans-3-hexenol aumentaron en el jitomate refrigerado, lo cual, de acuerdo con Tandon y colaboradores (2000) disminuiría su calidad.

En la actualidad, uno de los principales retos en la investigación de la horticultura poscosecha, es prestar más atención al sabor y a la calidad nutricional de las frutas y hortalizas lo cual permitirá mantener su calidad óptima y minimizar las pérdidas. Lo anterior deberá incluir la identificación de las razones que provocan que la vida poscosecha basada en el sabor sea más corta que la que se basa en la apariencia física (Kader, 2003).

El jitomate '7705' almacenado a 10 °C presentó una pérdida más rápida (6 días) de su calidad sensorial que de su apariencia física. Por lo tanto, sería recomendable estudiar si temperaturas de refrigeración más altas recomendadas para conservar la calidad basada en la apariencia física, pueden conservar por más tiempo la calidad integral (apariencia física, aroma y sabor) de esta variedad de jitomate cultivada en México.

8 CONCLUSIONES

El rango óptimo de temperatura de almacenamiento refrigerado para el jitomate en estado de madurez naranja de 10-12.5 °C fue establecido con base en parámetros físicos de calidad como son la textura y el color. Sin embargo, hay pocos estudios acerca del efecto de estas temperaturas en la calidad sensorial del jitomate.

Los resultados del presente estudio establecieron que la temperatura de refrigeración de 10 °C:

- Provocó un cambio de los volátiles del jitomate a partir del día 6 de almacenamiento, en particular, se observó un incremento en los niveles de trans-3-hexenol. Modificó, además otros alcoholes y aldehídos, lo cual aumentó la relación aldehído/alcohol de algunos de ellos (3-metilbutanal/3-metilbutanol y hexanal/hexanol).

- Disminuyó la actividad de la enzima ADH, que lleva a cabo la interconversión aldehído-alcohol. La disminución en la actividad de esta enzima en refrigeración, en el jitomate almacenado por 6 días en esta temperatura puede explicar el aumento en las relaciones aldehído/alcohol arriba mencionados.

- Provocó cambios en la percepción de algunos descriptores detectados por un panel de jueces entrenados. Por ejemplo, los jueces detectaron un aumento en la intensidad de los descriptores humedad solvente y medicinal y una disminución en la de té limón.

-El incremento en el volátil trans-3-hexenol presentó una correlación directa y positiva con su descriptor humedad solvente, así como con el descriptor medicinal; debido a ello se considera que este volátil pudiera servir como indicador del efecto de la baja temperatura en el aroma del jitomate '7705'.

9 PERSPECTIVAS

- Determinar en jitomates almacenados a 10 °C el perfil químico y sensorial del aroma a periodos más cortos de almacenamiento (0 a 6 días).
- Evaluar los parámetros de calidad, así como el perfil químico y sensorial del aroma del jitomate a temperatura ambiente, posterior a su almacenamiento refrigerado a 10 °C.
- Evaluar la expresión del gen de *adh2* en jitomate almacenado a 10 °C.
- Determinar mediante pruebas hedónicas, si los cambios percibidos por los jueces entrenados afectan la aceptación del fruto por el consumidor.
- Determinar el efecto del almacenamiento refrigerado a 12.5 °C en la conservación de la calidad integral del jitomate.

9 BIBLIOGRAFÍA

Arthur, C.L. y Pawliszyn J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62: 2145-2148.

Alexander, L. y Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2039-2055.

Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, Ch. Y. y González-Aguilar, G.A. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm.-Wiss.u.-Technology*, 37: 687-695.

Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. y Moshonas, M.G. 1991. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116: 265-269.

Baldwin, E.A., Scott, J.W., Einstein, M.A., Malundo, T.M.M., Carr, B.T., Shewfelt, R.L y Tandon, K.S. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 123: 906-915.

Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K. y Schuch, W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35: 1013-1021.

Baldwin, E.A., Goodner, K., Plotto, A., Pritchett, K. y Einstein, M. 2004. Effect of volatiles and their concentration on perception of tomato descriptors. *Journal of Food Science*, 69: S310-S318.

Barry, C.S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A.J. y Grierson, D. 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 9: 525-535.

Bezman, Y., Mayer, F., Takeoka, G.R., Buttery, R.G., Ben-Oliel, G., Rabinowitch, H.D. y Naim, M. 2003. Differential effects of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51: 722-726.

Bicsak, T.A., Kann, L.R., Reiter, A. y Chase, T. 1982. Tomato alcohol dehydrogenase: purification and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216: 605-615.

Boukobza, F. y Taylor, A.J. 2002. Effect of postharvest treatment on flavour volatiles of tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 25: 321-331.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bramley, P.M. 2000. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 54: 233-236.

Bruhn, C.M., Fedman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivas, E., Marshall, M., Riley, A., Thurber, D. y Williamson, E. 1991. Consumer perception of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14: 187-195.

Buescher, R.W. 1975. Organic acid and sugar levels in tomato pericarp as influenced by storage at low temperature. *HortScience*, 10: 158-159.

Buttery, R.G., Teranishi, R. y Ling, L.C. 1987. Fresh tomato aroma volatiles: A quantitative study. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 35: 540-544.

Buttery, R.G. y Ling, L.C. 1993. Volatile components of tomato fruit and plant parts: Relationship and biogenesis. In Teranishi, R., Buttery, R.G. y Sugisawa, H. (eds.), *Bioactive volatile compounds from plants: ACS Symposium Series No. 525*. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 23-24.

Carrari, F. y Fernie, A.R. 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1883-1897.

Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I. y Buret, M. 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 273-283.

Causse, M., Buret, M., Robini, K. y Verschave, P. 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science*, 68: 2342-2349.

Chang, S., Puryear, J. y Cairney, J. 1993. A simple efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Report*, 11: 113-116.

Chen, A.R.S. y Chase, T. 1993. Alcohol dehydrogenase 2 and pyruvate decarboxylase induction in ripening and hypoxic tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31: 875-885.

Christie, P.J., Hahn, M. y Walbot, V. 1991. Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 and protein activity in maize and rice seedlings. *Plant Physiology*, 95: 699-706.

Ciardi, J. y Klee, H. 2001. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany*, 88: 813-822.

Dandekar, A.M., Teo, G., Defilippi, B.G., Uratsu, S.L., Passey, J. A., Kader, A.A., Stow, J.R., Colgan, R. J. y James, D.J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research*, 13: 373-384.

Defilippi, B.G., Dandekar, A.A. y Kader, A.A. 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5694-5701.

Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. y Pichersky, E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of s-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *The Plant Cell*, 8: 1137-1148

Ellinger, S., Ellinger, J. y Stehle, P. 2006. Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention of a prostate cancer: do we have the evidence from intervention. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9: 722-727.

FAOSTADatabaseResults2008 <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>

Fellman, J.K., Miller, T.W., Mattinson, D.S. y Mattheis, J.P. 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35: 1026-1033.

Flores, F., Yahyaoui, F., Billerbeck, G., Romojano, F., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J. y Ambid, C. 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in charentais cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*, 53: 201-206.

Giovanucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, Lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 317-331.

Giovanucci, E. 2005. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. *The Journal of Nutrition*, 135: 2030S-2031S.

Gray, D.A., Prestage, S., Linforth, R.S.T. y Taylor, A.J. 1999. Fresh tomato specific fluctuations in the composition of lipoxygenase-generated C6 aldehydes. *Food Chemistry*, 64: 149-155.

Grob, K. 1973. Organic substances in potable water and its precursors. Part I: methods for the determination by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 84: 255-273.

Heintz, C.M. y Kader, A.A. 1983. Procedures for the sensory evaluation of horticultural crops. *HortScience*, 18: 18-22.

Hobson, G. y Grierson, D. 1993. Tomato. In Seymour, G., Taylor J. y Tiucker G. (ed). Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall Publishing. London, pp. 405-442.

Hobson, G. y Davies, J.N. 1980. The tomato. In Hulme, A.C. (ed.), The biochemistry of fruits and their products. Vol. 2. Academic Press. London, pp 437-482.

Ibañez, M.F.C. y Barcina, A.Y. 2001. Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, España.

Kader, A.A., Morris, L.L., Stevens, M.A. y Albright-Holton, M. 1978. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. Journal of American Society Horticultural Science, 103: 6-13

Kader, A.A. 2003. A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). HortScience, 38: 1004-1008.

Kader, A.A. 2008. Perspective flavor quality of fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 1863-1868.

Kausch, K.D. y Handa, A.K. 1997. Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. Plant Physiology, 113: 1041-1050.

Klee, H.J. 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2057-2063.

Lawless, H.T. y Malone, G.J. 1986. A comparison of scaling methods: sensitivity, replicates and relative measurement. *Journal Sensory Studies*, 1: 155–174.

Lelievre, J.M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M. y Pech, J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 101: 727-739.

Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K-H., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S. y Pichersky, E. 2001. Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalol by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology*, 127: 1256-1265.

Longhurst, T.J., Tung, H.F. y Brady, C.J. 1990. Developmental regulation of the expression of alcohol dehydrogenase in ripening tomato fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 14: 421-433.

Longhurst, T.J., Lee, E., Hinde, R., Brady, C.J. y Speirs, J. 1994. Structure of the tomato Adh2 gene and Adh2 pseudogenes, and a study of Adh2 gene expression in fruit. *Plant Molecular Biology*, 26: 1073-1084.

Luaces, P., Pérez, A.G. y Sanz, C. 2005. Effect of cold storage of olive fruits on the lipoxigenase pathway and volatile composition of virgin olive oil. *Acta Horticulturae*, 682: 993-998.

Malundo, T.M.M. Shewfelt, R.L. y Scott J.W. 1995. Flavor quality of fresh market tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 103-110.

Maul, F., Sargent, S.A., Balaban, M.O., Baldwin, E.A., Huber, D.J. y Sims, C.A. 1998. Aroma volatile profiles from ripe tomatoes are influenced by physiological maturity at harvest: an application for electronic nose technology. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 123: 1094-1101.

Maul, F., Sargent, S.A., Sims, C.A., Baldwin, E.A., Balaban, M.O. y Huber, D.J. 2000. Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *Journal of Food Science*, 65: 1228-1237

Miller, G.L. 1959. Use of DNS acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

Moretti, C.L., Baldwin, E.A., Sargent, S.A. y Huber, D.J. 2002. Internal bruising alters aroma volatile profiles in tomato fruit tissues. *HortScience*, 37: 378-382.

Nguyen, L.M. y Schwartz, S.J. 1999. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technology*, 53: 38-45.

Oeller, P.W., Wong, L.M., Taylor, L.P. Pike, D.A. y Theologis, A. 1991. Reverse inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254: 437-439.

Pelayo, C., Ebeler, S.E. y Kader, A.A. 2005. Cultivar and harvest date effects on flavor and other quality attributes of California strawberries. *Journal of Food Quality*, 28: 67-86.

Pelayo-Zaldívar, C., Ben-Abda, J., Ebeler, S.E. y Kader, A.A. 2007. Quality and chemical changes associated with flavor of 'Camarosa' strawberries in response to a CO₂-enriched atmosphere. *HortScience*, 42: 299-303.

Peralta, I.E., Knapp, S. y Spooner, D.M. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*, 56: 6-12.

Pillonel, L., Bosset, J.O. y Tabacchi, R. 2002. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35: 1-14.

Piggott, J.R., Simpson, S.J. y Williams, S.A.R. 1998. Sensory analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 33: 7-18.

Prestage, S., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J., Lee, E., Speirs, J. y Schuch, W. 1999. Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 131-136.

Rick, Ch.M. 1978. El tomate. *Investigación y Ciencia*, 25: 44-55.

Ruíz, J.J., Alonso, A., García-Martínez, S., Valero, M., Blasco, P. y Ruíz-Bevia, F. 2005. Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 54-60.

Sanz, C., Olias, J.M. y Perez, A.G. 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables p. 125-154. En F.A. Tomas Barberan & R.J. Robins (eds). *Phytochemistry of fruits and vegetables*, Cluredon Press., Oxford.

Sieso, V., Nicolas, M., Seck, S. y Crouzet, J. 1976. Constituants volatils de la tomate: mise en evidence et formation par voie enzymatique du trans-hexene-2-ol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40: 2349-2353.

Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Scott, N. S., Loveys, B. y Schuch, W. 1998. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiology*, 117: 1047-1058.

Speirs, J., Correll, R. y Cain, P. 2002. Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93: 137-142.

Stern, D.J., Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L., Scott, K. y Cantwell, M. 1994. Effect of storage and ripening on fresh tomato quality, Part I. *Food Chemistry*, 49: 225-231.

Stone, H y Siedel, J.L. 2004. *Sensory evaluation practices*. Elsevier-Academic Press, Redwood city, CA, USA.

Suslow, T.V. y Cantwell, M. 2006. *Tomato Recommendations for Maintaining Postharvest Quality*. Postharvest Technology Research and Information Center University of California, Davis, CA 95616.
<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Veg/tomato.shtml>

Tadmor, Y., Fridman, E., Gur, A., Larkov, O., Lastochkin, E., Ravid, U., Zamir, D. y Lewinsohn, E. 2002. Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2005-2009.

Tandon, K.S., Baldwin, E.A. y Shewfelt, R.L. 2000. Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill) as affected by medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 20: 261-268.

Tandon, K.S., Baldwin, E.A., Scott, J.W. y Shewfelt, R.L. 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *Journal of Food Science*, 68: 2366-2371.

Tanksley, S.D. 1979. Linkage, chromosomal association, and expression of *Adh-1* and *Pgm-2* in tomato. *Biochemical Genetics*, 17:1159-1167.

Tieman, D.M. y Klee, H.J. 1999. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology*, 120: 165-172.

Todd, J.F., Paliyath, G. y Thompson, J.E. 1992. Effect of chilling on the activities of lipid degrading enzymes in tomato fruit microsomal membranes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30: 517-522.

Wang, Ch., Chin, C., Ho, Ch., Hwang, Ch., Polashock, J.J. y Martin, Ch.E. 1996. Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavor compounds by expressing the yeast Δ -9 desaturase gene in tomato. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3399-3402.

Whitaker, B.D., 1993. Lipid changes in microsomes and crude plastid fractions during storage of tomato fruits at chilling and nonchilling temperatures. *Phytochemistry*, 32: 265-271.

White, P.J. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1995-2000.

Wilkinson, J., Lanahan, M., Yen, H., Giovannoni, J. y Klee, H. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science*, 270: 1807 -1809.

Yang, S.F. y Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 155-189.

Yilmaz, E. 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. *Turkish Journal of Agriculturae and Forestry*, 25: 149-155.

Zhou, D.B., Kalaitzis, P., Matoo, A.K. y Tucker, M.L. 1996. The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Molecular Biology*, 30: 1331-1338.

Zhu, H.L., Zhu, B.Z., Fu, D.Q., Xie, Y.H., Hao, Y.L. y Luo, Y.B. 2005. Role of ethylene in the biosynthetic pathways of aroma volatiles in ripening fruit. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52: 776-780.

ANEXO 1

Effect of Storage at 10°C on the Aroma of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Saladette Grown in Mexico

F. Díaz de León-Sánchez¹, L. López¹, F. Rivera-Cabrera¹, C. Pelayo-Zaldívar², B. Buentello¹, F.J. Fernández², L.J. Pérez-Flores¹, H.B. Escalona³ and A. García⁴

¹Department of Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., 09340, Mexico

²Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., 09340, Mexico

³Department of Development and Quality of Foods, CIATEJ, Guadalajara, Jalisco, 44270, Mexico

⁴Department of Analytical Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 05410, Mexico

Keywords: volatiles, flavor, quality, cold storage

Abstract

Tomato is a popular crop all over the world because of its nutritional value, attractive color and pleasant flavor. Although over 400 volatiles have been reported as components of the natural aroma of tomato, only 16 are considered to affect significantly the aroma. Odoriferous volatiles interacting with sugars and organic acids provide the typical flavor of tomato. Several reports indicate that in many fruit types the first quality attribute lost during cold storage is flavor. Thus, consumer complaints about lack of tomato flavor are frequent. The present work evaluated the effect of 10°C, the commercial cold storage temperature recommended for ripe tomatoes, on the chemical aroma profile of a tomato hybrid with good flavor grown in the state of Morelos, Mexico. Refrigeration effect on the level of eleven aroma compounds originated from different metabolic pathways was evaluated by gas chromatography. Results indicate that volatiles showing the greatest changes in tomatoes stored at 10°C were linalool, guaiacol, geranylacetone, 1-hexanol, hexanal, and 3-methylbutanol, in comparison to those kept at room temperature (20°C) during the initial 10 d of storage.

INTRODUCTION

The quality of a fruit, such as tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), comprises flavor (the result of taste and aroma perception), texture, appearance, and nutritional value. These qualities attribute change at different times during storage. Quality assessments of fruit kept at low temperatures in air or controlled atmospheres have shown that, of these quality attributes, flavor is the first to undergo modifications in storage, and flavor life is approximately 60% of the postharvest life based on appearance (Kader, 2003).

The familiar flavor of a fresh tomato is the result of complex interactions between acids, sugars and a large number of volatile compounds synthesized during fruit ripening (Baldwin et al., 2000). These volatiles are derived from the catabolism of a diverse group of precursors, including amino acids, fatty acids, lignins and carotenoids (Buttery and Ling, 1993; Sanz et al., 1997).

Good aroma and taste are important factors influencing sales, but fresh tomato flavor not always meets consumer expectations; thus many consumers would be willing to pay higher prices for a product with better flavor quality (Bruhn et al., 1991; Maul et al., 2000; Yilmaz, 2001). Commercial practices during harvest and postharvest handling periods of fresh tomato play an important role for flavor expression. Wrong practices such as harvesting immature fruits, mechanical damage and application of inadequate temperatures in cold storage can alter the aroma and taste of tomatoes (Sargent et al., 1997; Moretti et al., 1998). The adverse effects of low temperature on tomato flavor are well documented (Kader et al., 1978; Stern et al., 1994; McDonald et al., 1996; Maul et

al., 2000). However, the effect of the recommended storage temperature on tomato aroma has not been completely studied. For example, it is unknown for how long a ripe tomato can preserve its original chemical aroma profile. In the present work, the concentration and changes of aroma volatiles from different metabolic pathways are studied in ripe tomato at the recommended storage temperature.

MATERIALS AND METHODS

Saladette tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 'W4043' were harvested at the pink stage of maturity, in a greenhouse in the state of Morelos, Mexico, in May 2005 being selected for uniformity in color and size. The tomatoes were washed, sorted for defects, randomly divided into two groups and placed at 10°C, the recommended temperature for ripe tomato, and 20°C as control. Three replicates of 6 fruits were analyzed for aroma compounds at harvest and after 6, 10, 15, 20, 24 and 29 d of storage.

The extraction and concentration of aroma compounds was carried out from a sample of the juice obtained from the 6 fruits per replicate using the headspace solid phase microextraction technique (HS-SPME) described by Pelayo et al. (2005). Identification and quantification of volatiles was conducted in a gas chromatograph (Hewlett Packard Model 5800 series II) equipped with 0.32 mm × 60 m DB-WAXetr capillary column of 1 µm film thickness (J & W Scientific, Agilent Technologies USA) and a flame ionization detector (FID). Column temperature was initially 100°C, then it was raised to 220°C at a rate of 15°C/min and held constant for 7 min and raised again to 250°C at 10°C/min and held for 5 min. The injector and detector temperatures were both set at 250°C.

Statgraphics Plus for Windows 4.0 was used to perform analysis of variance (ANOVA) and Tukey mean comparisons of each of the main effects at $\alpha=0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Nine of the sixteen important tomato aroma volatiles previously reported (Baldwin et al., 1991; McDonald et al., 1996) were detected in the volatile fraction emitted by 'W4043' Saladette tomatoes (Table 1). 3-methylbutanal was not detected by the analytical procedures used, and the following aroma compounds were not analyzed in the present work: cis-3-hexenal, 6-methyl-5-hepten-2-one, methyl-nitro-butane, 1-nitro-2-phenyl-ethane, 1-penten-3-one and β -ionone. Several metabolic pathways are involved in the synthesis of the detected compounds. Hexanal, 1-hexanol, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol and 2-isobutylthiazole are synthesized from lipids; guaiacol from lignins; 3-methylbutanol comes from the amino acid leucine; geranylacetone derives from carotenoids; and linalool is synthesized by the isoprenoid pathway (Sanz et al., 1997; Baldwin et al., 2000).

In fresh tomatoes before storage, the volatiles hexanal, 3-methylbutanol, trans-2-hexenal and 2-isobutylthiazole were present in higher amounts than 1-hexanol, cis-3-hexenol, geranylacetone, guaiacol and linalool (Fig. 1). In tomato fruits kept at 20°C, the levels of 3-methylbutanol and trans-2-hexenal (Fig. 2), geranylacetone (Fig. 3), guaiacol and linalool (Fig. 4) decreased; while levels of hexanal and 1-hexanol increased significantly (Fig. 5), and those of 2-isobutylthiazole (Fig. 3) and cis-3-hexenol (Fig. 5) remained the same.

Changes in some volatiles were similar at both 10 and 20°C temperatures. Levels of 3-methylbutanol and trans-2-hexenal diminished slightly during the storage period in tomatoes at 10 and 20°C (Fig. 2). In contrast, Maul et al. (2000) working with 'BHN-189' tomatoes grown in Florida reported an important reduction in concentration of 3-methylbutanol and trans-2-hexenal in tomatoes stored at 10°C for 8 d. They also reported for 'BHN-189' and 'Solimar' tomatoes grown in Florida that the concentration of volatiles generated from carotenoids, particularly geranylacetone, slightly decreased in fruits stored at 10°C. In the present work the level of geranylacetone quickly decreased starting at 6 d of storage at 10 and 20°C (Fig. 3). The same trend was observed for the level of the phenolic aroma compound guaiacol, which decreased during storage at both temperatures (Fig. 4). Similarly, levels of linalool decreased quickly in tomatoes stored at

10 and 20°C from one to 15 d of storage, at which time only 10% of the initial level of this terpenic aroma compound remained (Fig. 4).

Low temperature affected the level of some aroma compounds. After only 6 d of storage, levels of hexanal and 1-hexanol in fruits stored at 10°C were lower than those of tomatoes kept at 20°C (Fig. 5). Also, levels of cis-3-hexenol were lower in fruits stored at 10°C than at 20°C, but only after 24 d of storage (Fig. 5). Similarly, levels of 2-isobutylthiazole were significantly lower in tomatoes stored at 10°C than at 20°C (Fig. 3). This result agrees with a previous report indicating that low temperatures consistently induce changes in the concentration of 2-isobutylthiazole (Maul et al., 2000), a volatile that has only been isolated from tomatoes (Petro-Turza, 1987). This aroma compound is responsible for medicinal, metallic or rancid notes in aqueous solutions at 50 µl/L (Kazeniak and Hall, 1970). The decrease in the level of 2-isobutylthiazole suggests that during the first days of storage, the Saladette tomato 'W4043' did not produce off-odors, which are apparently present when the level of this compound increases (Maul et al., 2000).

The mentioned changes in the aroma compounds of tomato 'W4043', might be associated with changes in the sensory profile obtained by trained judges. Perhaps, tomato flavor modifications start around day six of storage, and would become more evident after 10 d at 10°C, when the levels of six volatiles (hexanal, 1-hexanol, linalool, 3-methylbutanol, guaiacol and geranylacetone) of the eleven that were analyzed in the present work changed.

Specific changes in some of the aroma compounds found in 'W4043' tomatoes might only apply to the studied cultivar since different tomato cultivars exhibit distinct susceptibility to low temperatures (Maul et al., 2000).

CONCLUSIONS

Results showed that the storage temperature of 10°C induced modifications in the chemical aroma compounds of Saladette 'W4043' tomato and these changes were more evident after 10 d of storage.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by UAM and PROMEP RED UAM-I-CA- (UAM-I, UNACH and UC DAVIS) and PROMEP (No. 34775). We also thank UAM Scholarship and CONACYT for its financial supports (No. 193037) and (No. 34848) to Fernando Díaz de León-Sánchez during his Ph.D. studies (PNP Experimental Biology Program).

Literature Cited

- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Baker, R. and Scott, J.W. 1991. Quantitative analysis of flavor parameters in six Florida tomato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 39:1135-1140.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K. and Schuch, W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35:1013-1021.
- Buttery, R. and Ling, L. 1993. Volatiles of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. p.23-34. In: R. Teranishi, R. Buttery and H. Sugisawa (eds.), *Bioactive Volatile Compounds from Plants*, ACS Books, Washington.
- Bruhn, C.M., Fedman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivas, E., Marshall, M., Riley, A., Thurber, D. and Williamson, E. 1991. Consumer perception of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *J. Food Quality.* 14:187-195.
- Kader, A.A., Morris, L.L. Stevens, M.A. and Albright-Holton, M. 1978. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103:6-13.
- Kader, A.A. 2003. A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortScience* 38:1004-1008.

- Kazeniak, S.J. and Hall, R.M. 1970. Flavor chemistry of tomato volatiles. *J. Food Sci.* 35:519-530.
- Maul, F., Sargent, S.A., Sims, C.A., Baldwin, E.A., Baladan, M.O. and Huber, D.J. 2000. Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *J. Food Sci.* 65:1228-1237.
- McDonald, R.E., McCollum T.G. and Baldwin, E.A. 1996. Prestorage heat treatments influence free sterols and flavor volatiles of tomato stored at chilling temperature. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:531-536.
- Moretti, C.L., Sargent S.A., Huber, D.J., Calbo, A.G. and Puschmann, R. 1998. Chemical composition and physical properties of pericarp locule and placental tissues of tomato fruit with internal bruising. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:656-660.
- Pelayo, C., Ebeler, S.E. and Kader, A.A. 2005. Cultivar and harvest date effects on flavor and other quality attributes of California strawberries. *J. Food Qual.* 28:67-86.
- Petro-Turza, M. 1987. Flavor of tomato and tomato products. *Food Rev. Intl.* 2:309-351.
- Sanz, C., Olias, J.M. and Pérez, A.G. 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: F. Tomás-Barberena and R.J. Robins (eds.), *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Proc. of the Phytochemistry Society of Europe, vol. 41. Clarendon Press, Oxford p.125-155.
- Sargent, S.A., Maul, F., Moretti, C.L. and Sims, C.A. 1997. Harvest maturity, storage temperature and internal bruising affect tomato flavor. Proc. Florida Tomato Institute, University of Florida, IFAS. p.22-24.
- Stern, D.J., Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L., Scott, K. and Cantwell, M. 1994. Effect of storage and ripening on fresh tomato quality, Part I. *Food Chem.* 49:225-231.
- Yilmaz, E. 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. *Turk. J. Agric. For.* 25:149-155.

Tables

Table 1. Aroma compounds of tomato; those detected in Saladette tomato ‘W4043’ are marked by asterisks.

Chemical Groups	Impact Aroma Compounds ¹
Alcohols	3-methylbutanol* 1-hexanol* cis-3-hexenol*
Aldehydes	hexanal* trans-2-hexenal* cis-3-hexenal 3-methylbutanal
Ketones	1-penten-3-one 6-methyl-5 hepten-2-one
Alkane derivatives	methyl-nitro-butane
Sulfur compounds	2-isobutylthiazole*
Phenolics	guaiacol* ² 1-nitro-2-phenylethane
Terpenoids	linalool* geranylacetone* β -ionone

¹From: Baldwin, 2000.

²Guaiacol is not considered an important aroma compound of tomato, but was included because our preliminary sensory evaluation identified a clear medicinal note associated with this compound as one descriptor of the tomato aroma.

Figures

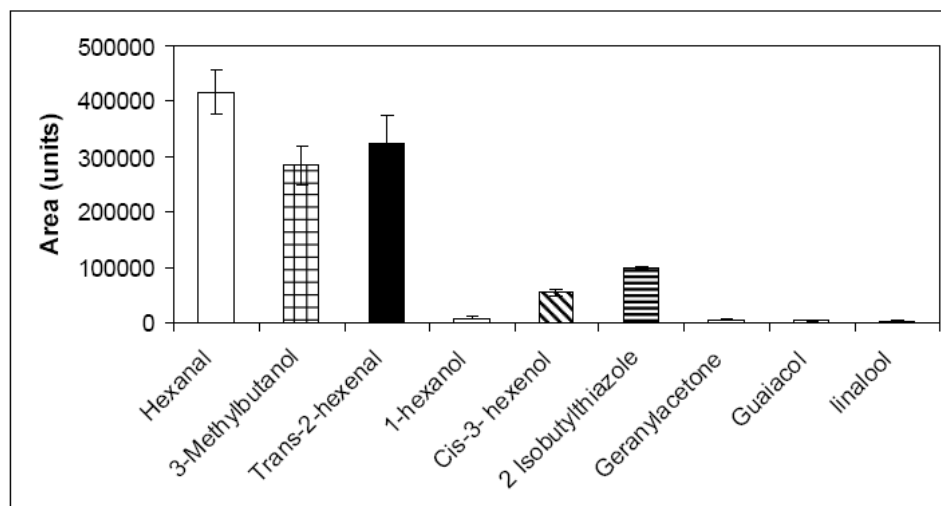


Fig. 1. Initial levels of compounds detected in the volatile fraction of ‘W4043’ tomato juice.

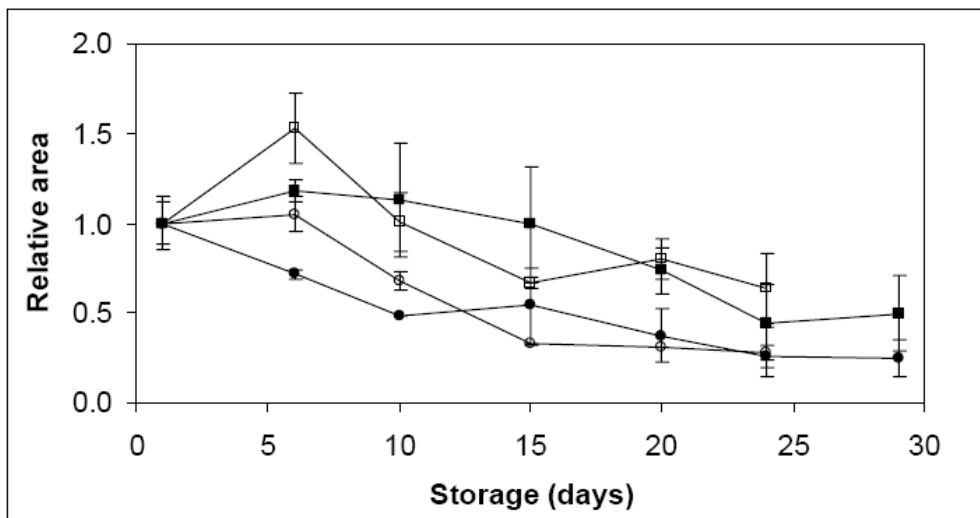


Fig. 2. Level of 3-methylbutanol 10°C (●), 3-methylbutanol 20°C (○), trans-2-hexenal 10°C (■) and trans-2-hexenal 20°C (□) as relative areas in relation to absolute area found in fresh tomato before storage.

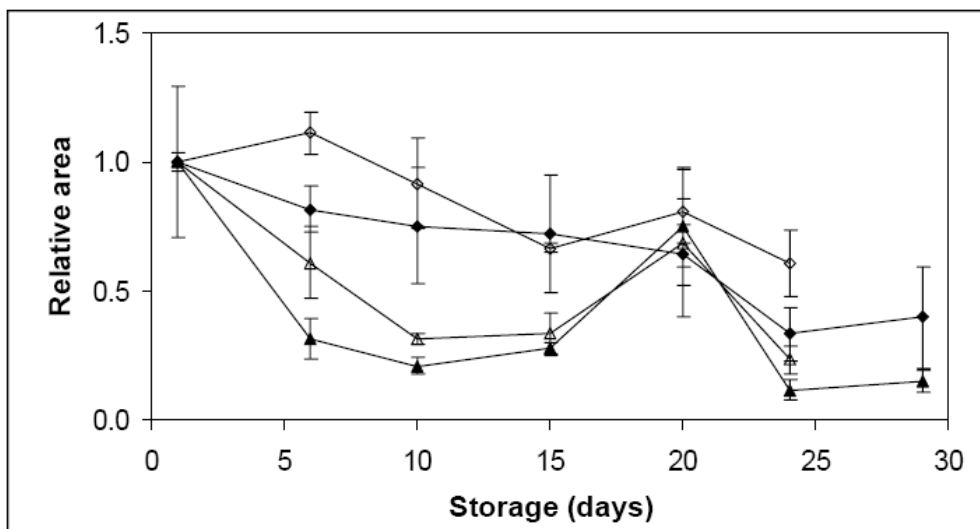


Fig. 3. Level of 2-isobutylthiazole 10°C (◆), 2-isobutylthiazole 20°C (◇), geranylacetone 10°C (▲) and geranylacetone 20°C (△) as relative areas in relation to absolute area found in fresh tomato before storage.

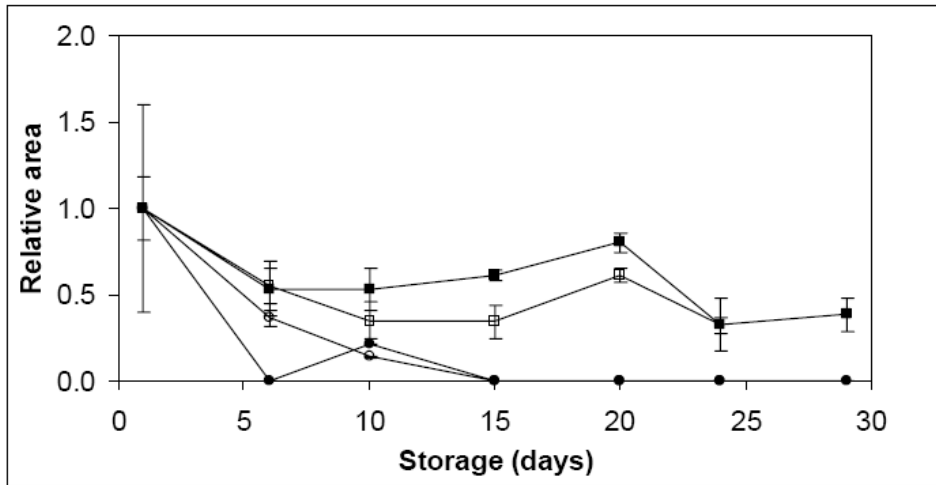


Fig. 4. Level of guaiacol 10°C (■), guaiacol 20°C (□), linalool 10°C (●) and linalool 20°C (○), as relative areas in relation to absolute area found in fresh tomato before storage.

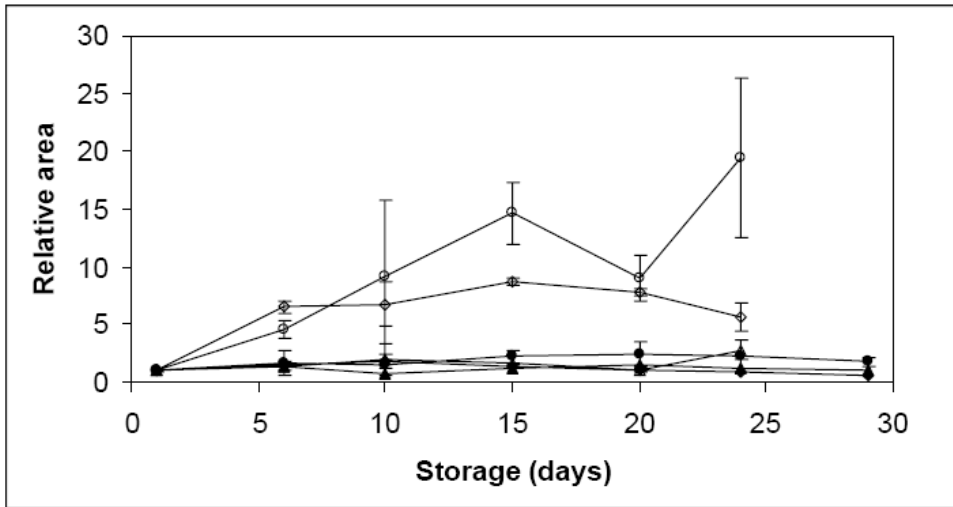


Fig. 5. Level of hexanal 10°C (◆), hexanal 20°C (◇), 1-hexanol 10°C (●), 1-hexanol 20°C (○), cis-3-hexenol 10°C (▲) and cis-3-hexenol 20°C (△) as relative areas in relation to absolute area found in fresh tomato before storage.

ANEXO 2

Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity

in tomato fruit

Fernando Díaz de León-Sánchez^a, Clara Pelayo-Zaldívar^b, Fernando Rivera-Cabrera^a, Mónica Ponce-Valadez^a, Xóchil Ávila-Alejandre^a, Francisco J. Fernández^b, Héctor B. Escalona-Buendía^c and Laura J. Pérez-Flores^{a*}.

^aDepartments of Health Sciences and ^bBiotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. México D.F., CP 09340, México. ^cCIATEJ, Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco, CP 44270, México.

Abstract

Recommended temperatures for refrigerated storage of tomato (*Solanum lycopersicum*) has been established based on maintenance of physical and visual characteristics, without considering their effect in tomato flavor. In this study, the effect of refrigerated storage (10 °C) was compared to storage at 20 °C on the volatile chemical profile of the aroma of light red tomato '7705' using GC-MS. Changes in the aroma volatiles profile were correlated with a sensory analysis, using the Quantitative Descriptive Analysis (QDA) method, and with alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme activity. Refrigeration induced changes in levels of 3-methylbutanal, linalool, guaiacol, hexanol, trans-2-hexenal and trans-3-hexenol. Some of these alterations may be explained by a decrease in ADH enzyme activity observed in refrigerated tomato and they were reflected in the aroma perception as an increase in the descriptors solvent-humidity and medicinal and a decrease in the descriptor lemon tea.

Keywords: volatiles, sensory evaluation, flavor, postharvest quality, refrigeration, alcohol dehydrogenase, tomato.

1. Introduction

Tomato is one of the most important and popular horticultural crops in the world. Overall and per capita consumption of this produce has been traditionally large because of its versatile culinary use. In the last decade, consumption values have increased due to its nutritional and recently recognized functional properties. Tomatoes are an important source of antioxidants and vitamins (Yilmaz, 2001; Causse et al., 2003). Lycopene, the red pigment in tomato, is considered the most efficient singlet oxygen quencher among biological carotenoids, and an active substance significantly related to a lower incidence of prostate cancer (Giovannucci, 1999, 2005; Bramley, 2000; Ellinger et al., 2006).

Good aroma and taste are important factors influencing tomato commercialization. In the last years, consumers have complained about poor flavor in tomato (Bruhn et al., 1991; Baldwin et al., 2000). They consider the new long-shelf life cultivars less tasty than the traditional ones and would pay higher prices for a product with better flavor quality (Baldwin et al., 2000; Causse et al., 2001; Ruíz et al., 2005).

The lack of tomato “homegrown” flavor could be explained by several reasons. Traditionally, breeders have made the selection of new varieties based on yield, visual characteristics, slow ripening and resistance to diseases and transport, neglecting sensorial characteristics such as aroma and taste (Maul et al., 2000; Ruíz et al., 2005). Harvest of immature fruits, mechanical damage, inadequate postharvest treatments and storage conditions can adversely affect the flavor of ripe tomatoes (Kader et al., 1978; Maul et al., 1998; Baldwin et al., 2000; Moretti et

al., 2002). Inappropriate ethylene ripening programs as well as storage at excessively low temperatures have detrimental effects on aroma and taste of tomatoes (Kader et al., 1978; Stern et al., 1994; Maul et al., 2000).

The characteristic flavor of a fresh tomato is the result of complex interactions between organic acids, soluble sugars and over 400 volatile compounds that are synthesized during the ripening process in the intact fruit (primary aroma compounds) and upon tissue disruption (secondary aroma compounds) (Sanz et al., 1997; Baldwin et al., 2000). From the large number of volatiles present in tomato, only about 30 are considered impact aroma compounds since they have positive values of odor logarithms (Buttery, 1993; Baldwin et al., 2000). These volatiles are derived from different biochemical pathways such as the catabolism of lipids, aminoacids, lignins and carotenoids (Sanz et al., 1997).

Alcohol dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) is considered an important enzyme which contributes to flavor development by interconverting aldehyde and alcohol forms of flavor volatiles originated from lipids and aminoacids (Sieso et al., 1976). In tomato, two ADH genes have been identified. ADH1 is found in pollen, seeds and young seedlings and ADH2 accumulates in tomato fruit during ripening when there is a large increase in the synthesis of flavor volatiles. Therefore, it has been suggested that ADH2 may play an important role in flavor development (Longhurst et al., 1990).

Quality of fresh tomato fruit is determined by external (size, shape, color, appearance) and internal (aroma, taste, texture) attributes. Each quality attribute changes at different rate during storage. It has been shown that flavor is the first quality attribute to undergo modifications in refrigeration both in air and controlled

atmospheres storage (Kader, 2003, 2008). The adverse effects of excessively low temperature on tomato flavor are documented (Kader et al., 1978; Buttery et al., 1987; Stern et al., 1994; Maul et al., 2000). Maul et al. (2000) evaluated the influence of storage temperature on taste and aroma of two tomato cultivars ('Solimar' and 'BHN-189') by sensory analysis using trained panelists. They reported changes in taste and aroma in response to storage temperatures, but they did not identify individual aroma compounds responsible for these differences.

In order to determine the effect of refrigerated storage on sensory quality in tomato fruit, in the present work the effect of the recommended storage temperature for light red tomatoes (10 °C) on individual aroma volatiles and their corresponding sensory descriptors, as well as the activity of ADH enzyme were studied. This represents one of the first studies on the effect of refrigerated storage on tomato aroma composition and its perception by sensory evaluation, as well as its correlation with ADH enzyme activity in an important tomato cultivar ('7705') grown in a Mexican region. The practical implication of this study is to find the optimal temperature to maintain not only the physical quality but also the sensory attributes of the fruit.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Saladette tomatoes (*Solanum lycopersicum*) '7705' were grown in a commercial greenhouse in the state of Hidalgo, Mexico and were harvested at a light red stage, in September 2005. Fruit were uniform in color and size.

2.2. Experimental design

Tomatoes were washed, sorted for defects, randomly divided into two groups of 160 fruit and placed at 10 °C, the recommended temperature for light red tomato fruit, and at 20 °C as control with 86 ± 2 and $83 \pm 2\%$ relative humidity, respectively. Three replicates of 6 fruit were analyzed for quality attributes, aroma compound levels and ADH enzymatic activity, and 22 fruit were used for sensory analysis at harvest and after 6, 9, 14 and 20 d of storage.

2.3. Quality parameters determinations

Tomato color was measured with a colorimeter Color Flex (Hunter Lab, Reston, USA) on three locations of each fruit, two equatorial and one on the blossom end. Lightness (L^*), chroma (C^*) and hue (h) values were registered. The same tomatoes were used to determine firmness by a fruit pressure tester FT 327 (Effe-Gi, Milan, Italy) and the readings in kgf were converted into Newtons (N). Fresh juice was obtained from each replicate of 6 fruit with a domestic juice extractor, frozen and stored at -70 °C until analysis. Soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), reducing sugars and aroma compounds were measured in samples of juice. SSC was determined with an Atago N-1 alfa hand-held refractometer (Atago

Co Ltd, Tokyo, Japan) and results were expressed in percentage. TA was measured by titration with 0.1 mol L^{-1} NaOH and reported as percentage of citric acid. Reducing sugars were evaluated spectrophotometrically using dinitrosalicylic acid reagent (DNS) (Miller, 1959).

2.4. Aroma composition

Extraction and concentration of aroma volatiles were made by using a headspace solid phase microextraction technique (HS-SPME) (Harmon, 1997; Pelayo et al., 2005; Pelayo et al., 2007). Three types of fiber coating were tested: $75 \mu\text{m}$ CAR-PDMS, $65 \mu\text{m}$ PDMS-DVB, and $50/30 \mu\text{m}$ DVB-CAR-PDMS (Supelco Bellefonte, PA, USA). The best results were found with the $50/30 \mu\text{m}$ DVB-CAR-PDMS fiber. Several adsorption times were also tested, finding no significant differences in peak areas between 10 min and longer periods of adsorption. In regard to desorption time, 5 min at $250 \text{ }^\circ\text{C}$ was used since after this time no carryovers were observed.

To limit the formation of aroma artifacts by oxidative and enzymatic reactions, as soon as juice was extracted from tomato samples, 2 mL of a 0.5 mol L^{-1} EDTA in 0.625 mol L^{-1} NaOH solution were added to 18 mL of the juice sample in order to obtain a final pH of 6.2–6.5 (Pelayo et al., 2007). Then, samples were frozen and stored at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Juice samples were thawed and a 3 mL aliquot was placed in a 20 mL vial containing 1.2 g of NaCl to facilitate the release of aroma compounds from the matrix to the headspace by a salting out effect (Harmon, 1997) and sealed with a teflon-silicone septum and a metallic ring. The vial was

equilibrated at 30 °C. Some researchers conduct the analysis of volatiles at 80 °C, but at this temperature some derivatives can be generated. The headspace was sampled by inserting the DVB/CAR/PDMS SPME fiber for 10 min. Volatiles were then desorbed from the fiber for 5 min at 250 °C during splitless (purge time 3 min) injection into a gas chromatograph (Hewlett Packard 5800 series II, Palo Alto, USA) equipped with a 0.32 mm x 60 m DB-WAXETR capillary column of 1 µm film thickness (J & W Scientific, Folsom, USA) and a flame ionization detector (FID). Initial column temperature was 60 °C and it was held constant for 90 min, then it was raised to 230 °C at a rate of 2 °C/min and maintained for 15 min. Injector and detector temperatures were set at 250 °C and 280 °C, respectively. Acetone and nonanol were used as internal standards to verify the reproducibility of each analysis. Samples were repeated when variations of the internal standard areas were higher than 10% of the standard deviation calculated from preliminary tests.

Identification of volatiles was made by gas chromatography (GC) (Hewlett Packard 5800 series II Palo Alto, USA) coupled to a mass selective detector (series 5972, Hewlett Packard Palo Alto, USA) operated at a rate of 4 scans/s over the mass range (m/z) of 40-450 and with an electron ionization energy of 70 eV, using reference spectra in NBS75KL mass-spectra library and confirmed by comparison with authentic chemical standards.

Typical components of the tomato aroma coming from different metabolic pathways were analyzed including lipid derivatives (hexanal, hexanol, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, trans-3-hexenol and 2-isobutylthiazole), volatiles synthesized from carotenoids (geranylacetone), amino acids (3-methylbutanol and

3-methylbutanal), lignin (guaiacol) and the terpenic compound linalool (Baldwin, et al., 2000). From these volatiles, hexanal, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, 2-isobutylthiazole, geranylacetone, 3-methylbutanal and 3-methylbutanol are considered impact aroma compounds (Buttery, 1993; Buttery and Ling 1993).

2.5. Preparation of crude extract and determination of ADH activity

The enzyme extraction and the quantifying assay were performed according to Longhurst et al. (1990) with some modifications. Five grams of fresh tissue were homogenized in 10 mL of cold extraction buffer (1 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4, 5 mmol L⁻¹ DTT, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1% PVPP) using purified commercial sea sand. The homogenate was centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used directly as the enzyme extract. ADH activity was determined at 25 ± 2 °C with a spectrophotometer (Beckman DU 650, Fullerton, USA) as the increase of absorbance at 340 nm due to NADH accumulation. The reaction mixture contained 1 mL of 1 mmol L⁻¹ NAD⁺ in 50 mmol L⁻¹ Glycine-KOH buffer pH 9.6, and 1 mL of enzyme extract. One milliliter of 0.5 mol L⁻¹ ethanol was added to initiate the reaction. The mixture was mixed and the change in absorbance was measured for 3 min. As indicated in the experimental design three samples of 6 fruit were analyzed for ADH activity and each sample was measured three times. One unit of ADH is defined as the amount of enzyme required to produce 1 μmol of NADH min⁻¹. Protein content was determined by Bradford method (Bradford, 1976).

2.6. Sensory analysis

All sensory evaluations were performed in a specially designed room, which provided space for eight assessors at a time in eight separate booths divided by vertical walls. Red lights were used to illuminate the sensory evaluation room to minimize the influence of color on the assessors' perceptions. The samples were presented to the assessors through sliding doors between the sensory preparation room and each of the eight booths.

2.6.1. Training of the sensory panel

The sensory panel consisted of 22 assessors (18 women and 4 men, 20-60 years old) recruited from students and staff of the Universidad Autónoma Metropolitana. The assessors were selected based on their willingness to consume fresh tomatoes and the absence of negative reactions or allergies to this fruit. All assessors were trained once a week during 13 weeks according to the methodology of Quantitative Descriptive Analysis (Stone and Siedel, 2004). In the first sessions assessors were asked to describe the odor of tomato products (sauce, juice and puree), in their own words using odor qualities that came into their minds. Aqueous standards solutions of the eleven studied volatiles were prepared at a concentration where 60% of the assessors considered clearly perceptible. A list of descriptors was created from the terms suggested by the assessors. In the following sessions, the panel reached a consensus correlating selected volatile compounds used as references with the descriptors of tomato

samples (Table 1). Thereafter, assessors were presented with different concentrations of standard solutions and asked to evaluate the intensity of each descriptor. Based on these results, a graphic 100 mm scale of intensity (using the markers not perceptible, medium and high) was elaborated for training purposes and for evaluating the repeatability of the assessors. They were also trained to recognize similarities and differences in the aroma of whole and cut tomatoes at different ripening stages and from different storage temperatures as well as during the tasting process (discriminative tests).

2.6.2. Sensory tests

Sensory tests were conducted at noon. Standard solutions for the eleven analyzed volatiles were prepared in medium and high concentrations (Table 1). Whole tomatoes were kept in closed polystyrene containers at least 1 h before sensory evaluation was conducted to allow the accumulation of aroma volatiles in the headspace. Samples coded with random numbers were served at room temperature (25 °C) and presented in random order to the panelists together with the standard solutions. In each session, assessors were presented with tomatoes stored at 10 and 20 °C and with fresh tomatoes as reference. Evaluations were conducted using a random block design where the study factor was the storage temperature and the block factor was the assessor. Chamomile tea was provided to assessors for resting their olfactory sense. Assessors were asked to evaluate changes in the intensity of the eleven aroma descriptors in stored tomatoes using a 100 mm unstructured scale (from 0, not perceptible to 10, that correspond to the

high level concentration of the standard) immediately after opening the container, after cutting the tomato and after tasting portions of the fruit. Only results from cut tomato are presented because the cutting process releases greater amounts of volatiles than whole fruit, facilitating the aroma sensory perception. Also, the time elapsed between the cutting and the aroma sensory perception was short enough to limit the generation of secondary aroma compounds. On the other hand, results of aroma perception from cut tomato and those obtained from tasting portions of the fruit were similar.

2.7. Statistical analysis

SSC, reducing sugars, TA, firmness, color parameters, aroma volatile concentrations and levels of sensory descriptors were analyzed by ANOVA (one way for physicochemical parameters and two ways for sensory evaluation with no interaction) and Tukey's mean comparisons ($\alpha=0.05$). A correlation analysis between volatile compounds and sensory descriptors was performed ($p \leq 0.1$). All statistical analysis were performed with Statgraphics Plus for Windows 4.0 (StatPoint, Inc. Herndon, USA).

3. Results and discussion

3.1. Quality parameters

It has been reported that metabolic activity of refrigerated tomatoes is slower than that of fruit kept at room temperature, thus in this study we analyzed the effect of refrigeration (10 °C) on quality parameters. SSC in tomatoes kept at 10 °C showed no change until the end of the storage (20 d) when it decreased, while no changes were observed at 20 °C in this parameter during the entire storage period (14 d). However, no significant effect of temperature on SSC changes was detected (Table 2). Levels of reducing sugars were significantly lower after 9 d of storage in refrigerated tomato than in tomato ripened at 20 °C. TA and firmness in tomato kept at 10 °C did not change during storage, but at 20 °C both quality parameters decreased at 14 and 9 d of storage, respectively (Table 2). As has been previously reported, fruit held at 10 °C had a lower sugar/acid ratio than those stored at room temperature (Kader et al., 1978).

On the other hand, color parameters L^* and h did not change in tomato fruit stored at 10 °C, but in fruit kept at 20 °C these parameters decreased at 6 d of storage when fruit color changed from light red to red, while L^* and h values remained without significant changes for the rest of the storage period (Table 2). The color C^* parameter increased at 10 °C while decreased at 20 °C from 6 d on.

These results indicated that the quality attribute that first changed in fully red ripe fruit during storage at 20 °C was texture (at 9 d of storage) followed by TA (at 14 d of storage). Furthermore, once the tomatoes reached their maximum color development (at 6 d of storage at 20 °C) no further changes occurred in L^* and h values. Therefore, during the storage at 20 °C tomatoes became less acidic, softer and developed a darker and more red color than those kept at 10 °C (Table 2).

The effect of temperature on the analyzed quality attributes of tomato '7705' was not consistent with changes reported by Maul et al. (2000), in other tomato cultivars ('BHN-189' and 'Solimar'). According to their results regarding TA changes during storage, 'Solimar' but not 'BHN-189' tomatoes became less acidic at 20 °C than those stored at 5 and 12.5 °C. In regard to values of reducing sugars, 'Solimar' tomatoes became less sweet at both 10 and 20 °C while 'BHN-189' fruit did not show any change in this parameter at 5, 12.5 and 20 °C. These results support the fact that susceptibility to low temperatures is cultivar dependent and consequently, quality parameters are affected in a different form.

3.2. Volatile compounds

Qualitative and quantitative changes that have an effect in the aroma and flavor profiles take place during ripening in tomato fruit (Watada and Aulenbach, 1979; Maul et al., 2000). In the present study, the chemical profile of aroma volatiles during ripening at room temperature (20 °C) was analyzed in tomato '7705' harvested at light red stage. In general, the total area of the volatiles tend to increase during storage (if hexanal is included) changing from 2761×10^3 at the initial analysis to 3507×10^3 , 3044×10^3 , 4388×10^3 after 6, 9 and 14 d of storage, respectively. Among the volatile compounds analyzed in this study, hexanal was the most abundant and increased from 42% of the total area of volatiles in the initial analysis to 79% by the end of the storage period. However, if the hexanal is excluded from the volatile analysis, a significant decrease in the total area of

volatiles is observed during storage (from 1620×10^3 to 930×10^3 at 0 and 14 d respectively).

The main changes in the chemical profile of the volatiles at 20 °C took place from 0 to 6 d of storage when tomato fruit went from light red to red stage (Tables 3 and 4). Among the volatiles derived from aminoacids, a decrease of 3-methylbutanol was observed after 6 d of storage while 3-methylbutanal decreased only after 14 d (Table 3). The terpenic compound linalool and the geranylacetone (derived from carotenoids) significantly decreased after 6 d, while guaiacol (derived from lignins) decreased after 9 d of storage (Table 3). Regarding the lipid derived volatiles, hexanol and cis-3-hexenol showed a drastic decrease during storage, while, as mentioned earlier, hexanal concentration increased; trans-2-hexenal showed a transitory increase at 6 d and trans-3-hexenol and 2-isobutylthiazole levels were not significantly altered (Table 4).

In previous studies performed in tomato varieties BHN-89 and Solimar, Maul et al. (2000) reported similar results to those obtained in the present study for 3-methylbutanol, cis-3-hexenol and hexanal. However, geranylacetone, trans-2-hexenal and 2-isobutylthiazole showed a different behavior in these varieties compared to the results observed in tomato '7705', which supports that changes in the aroma profile are dependent on the cultivar studied (Baldwin et al., 1991; Ruíz et al., 2005).

In tomato fruit '7705' stored at 10 °C, the total area of volatiles was significantly lower than that observed in fruit held at 20 °C (2761×10^3 , 2310×10^3 , 2131×10^3 , 2140×10^3 and 2558×10^3 at 0, 6, 9, 14 and 20 d of storage, respectively). These results were similar to those observed for the cultivar BHN-189, while in Solimar, a

higher volatile development in fruit stored at 10 °C in comparison to tomato held at 20 °C was observed (Maul et al, 2000). These authors suggested that changes in volatiles in response to low temperature are cultivar dependent.

In refrigerated tomatoes, the main modifications in the chemical profile of aroma were detected at 6 d compared to the initial analysis, as it was also observed for fruit stored at 20 °C; later, changes in volatile areas showed few alterations (Tables 3 and 4). When these changes were compared between tomatoes stored at 10 °C, 20 °C and initial values, hexanol was the only volatile compound that showed significantly lower levels at 10 °C after 9 d of storage (Table 4). On the other hand, levels of 3-methylbutanal and trans-2-hexenal were significantly higher in refrigerated tomatoes than in fruit stored at 20 °C at 9 d while trans-3-hexenal, linalool and guaiacol showed the same trend at 14 d. Geranylacetone and 3-methylbutanol, decreased with respect to the initial values in both temperatures; even though the decrease was faster at 20 °C, while cis-3-hexenal and 2-isobutylthiazole behave similarly at both studied temperatures. Regarding the most abundant compound, hexanal, its levels were maintained constant at 10 °C during the whole storage period while this compound increased dramatically at 20 °C (Tables 3 and 4).

There are very few reports about the temperature effect on the chemical profile of aroma in tomato and in general, these studies analyzed the effect of low temperatures during storage compared to the initial volatile levels (Buttery et al., 1987; Stern et al., 1994; Maul et al., 2000; Boukobza and Taylor, 2002). In most of these reports, it was observed that refrigeration affected levels of 3-methylbutanol, trans-2-hexenal, hexanal, cis-3-hexenal and 2-isobutylthiazole; although the

modified compounds depended on the analyzed cultivar (Stern et al., 1994; Maul et al., 2000; Boukobza and Taylor, 2002).

Results from the literature and the present study pointed to lipid and amino acid metabolism as some of the synthetic pathways for aroma volatiles that were affected by low temperatures. To this respect, it has been suggested that modifications in volatiles might be the result of alterations in the precursors availability, changes in the enzymatic systems or deficiencies in the energy state due to mitochondrial damage (Lyons and Raison, 1970; Buescher, 1975; Todd et al., 1992; Whitaker, 1993; Boukobza and Taylor, 2002).

As mentioned earlier, a decrease in hexanol and an increase in 3-methylbutanal levels at 9 d of storage were some of the first modifications in volatiles detected at low temperature. Since these compounds can be derived from alcohol-aldehyde transformations, the effect of refrigerated storage on aldehyde/alcohol ratios was analyzed. During storage at 10 °C, there was a significant increase in 3-methylbutanal and a significant decrease in 3-methylbutanol; resulting in an increase in the aldehyde/alcohol balance (i.e. the 3-methylbutanal/3-methylbutanol quotient) compared to the initial analysis (Table 5). Even though hexanal/hexanol ratio also increased over time in fruit stored at 10 °C, these changes were only affected by a decrease in hexanol while hexanal levels were maintained constant. These results suggest that at 10 °C, activity of ADH2 might be affected. Activity of this enzyme increase during tomato ripening and has been implicated in the interconversion of aldehyde and alcohol aroma volatiles (Longhurst et al., 1990; Chen and Chase, 1993).

3.3. ADH2 activity

To our knowledge, there are no reports in the literature about the effect of low temperature on fruit ADH activity. In tomatoes '7705' held at 20 °C, ADH2 enzyme activity was maintained constant with respect to its initial levels during the whole storage period. At 10 °C, a significant decrease in the activity of this enzyme was observed at 6 d with respect to the initial levels; after this point the enzyme activity was maintained constant until the end of the treatment and it was always lower than in fruit ripened at 20 °C (Fig. 1). Concomitant with this decrement of ADH2 activity after 6 d at 10 °C, the aldehyde/alcohol balance increased (Table 5). These results are consistent with those reported by Prestage et al. (1999) who found a significant increase in the 3-methylbutanal levels in transgenic tomatoes with low ADH2 activity. To determine if the mechanism of regulation of ADH2 in response to low temperature is transcriptional or post-transcriptional, we are currently quantifying the transcripts and protein levels of ADH2.

3.4. Sensory evaluation

It has been reported that even small changes in the chemical profile of tomato flavor may have effects in sensory perception (Maul et al., 2000; Tandon et al., 2003; Baldwin et al., 2004). As mentioned earlier, refrigeration at 10 °C induced significant modifications in the profile of aroma volatiles in tomato fruit '7705', thus, a sensory analysis was performed to determine if there was a correlation of the observed chemical changes with the assessors aroma perception. In general, the

trained assessors did not detect changes in the aroma descriptors in tomatoes stored at 20 °C. The only descriptors that showed significantly transitory changes after 9 d of storage at 20 °C were rancid oil, which increased, and lemon tea, which presented a decrease (Table 6). The alteration in the descriptor rancid oil did not show high correlations neither with its associated volatile, 3-methylbutanal, nor with any of the other analyzed volatiles. Even though there was not a high correlation of the descriptor lemon tea with its associated volatile, linalool ($r= 0.37$), it is important to mention that the decrease of this descriptor after 9 d of storage was preceded by a decrease in linalool levels at 6 d (Tables 3 and 6). Solvent-humidity was the only descriptor for which assessors detected a significant increase from 6 d on in refrigerated tomatoes compared to fruit stored at 20 °C (Table 7).

Assessors perceived a considerable modification in some of the descriptors of the aroma when refrigerated tomatoes were compared to freshly harvested tomatoes. These alterations may be associated to the changes in aroma volatiles induced by refrigeration. In particular, assessors detected an increase ($p < 0.05$) in the intensity of the descriptor solvent-humidity and a decrease ($p < 0.05$) in the descriptor lemon tea from 6 and 9 d on, respectively (Tables 6 and 7). Assessors also detected a transitory increase ($p < 0.05$) in the descriptor medicinal at 6 d of storage and they also detected a significant decrease in the descriptor almond oil at 20 d (Tables 6 and 7).

For the correlation study, r values were considered significant according to a t test (P value < 0.1) (Table 8), this criterion is similar to that reported in previous studies (Maul et al., 2000). In tomatoes stored at 10 °C, solvent-humidity was the

only descriptor that showed a direct positive correlation with its associated volatile trans-3-hexenol ($r= 0.83$), while the decrease in the descriptor almond oil presented a negative correlation with the increase in its associated volatile trans-2-hexenal ($r= -0.97$). On the other hand, although the decrease in the descriptor lemon tea showed a low correlation with its respective volatile (linalool), it is important to mention that both the descriptor and the volatile showed a decrease during the refrigerated storage. The descriptor lemon tea presented high positive correlations with changes in 3-methylbutanol ($r= 0.93$) and geranylacetone ($r= 0.95$) levels and an elevated negative correlation with levels of 3-methylbutanal ($r= -0.89$). Regarding the descriptor medicinal, it did not show a direct linear correlation with the changes in its associated volatile, guaiacol. However, this descriptor showed a high correlation with trans-3-hexenol ($r= -0.78$). Even though this volatile is not mentioned in the literature as an impact compound in tomato aroma, it results interesting that in the variety 7705 its levels increased during refrigeration and these changes were correlated with alterations in several descriptors of the aroma in this variety.

One of the objectives of this study was to correlate changes in the aroma volatiles with sensory descriptors and it is important to point out that the associated volatile used as reference by the trained panel for a specific descriptor was not always involved. To explain this phenomenon, it has to be considered that the assessors made the descriptors designation based on individual standards of pure volatiles diluted in water. There are reports in the literature that show that aroma perception depends on the medium of evaluation (Tandon et al., 2000; Bezman et al., 2003). Moreover, tomato aroma is the result of a mix of approximately 400

volatiles that are interacting. These interactions may affect the perception of individual aroma volatiles. Consequently, changes in a descriptor detected by the assessors may be due to modifications in the volatiles proportions, even though the compound associated to the descriptor does not show any change.

According to Tandon et al. (2000); Tandon et al. (2003) and Baldwin et al. (2004), perception of individual compounds does not reflect the interactive effect present in whole fresh tomato or during the fruit tasting, where aroma perception is affected by the sense of taste. Since it has been reported that sample homogenization may alter the aroma due to the breaking of skin and seeds that does not occur in the natural chewing process (Speirs et al., 1998; Prestage et al., 1999), in the present study, samples of cut tomato were used for sensory evaluation.

Tandon et al. (2000) identified some volatiles that are involved in the tomato sensory quality. Specifically, they suggested that an increase in volatiles responsible of the floral (6-methyl-5-hepten-2-one and β -ionone), fruity (cis-3-hexenal and geranylacetone) and fresh notes (3-methylbutanol and 1-penten-3-one), together with a decrease in those responsible for rancid (hexanal, trans-2-hexenal and 3-methylbutanal) and sour notes (2-isobutylthiazole) could improve the tomato flavor. In our work, levels of 3-methylbutanal and trans-2-hexenal increased in tomato '7705' stored at 10 °C from 6 d on. These changes would have an adverse effect in tomato flavor according to Tandon et al. (2000). However, it would be necessary to develop studies with consumers to determine how the changes in aroma volatiles affect the tomato sensory quality and its acceptability.

4. Conclusions

Optimal recommended storage temperature for light red tomato fruit of 10 °C is based mainly on physical quality parameters such as texture and color. However, there are very few studies about the effect of low temperature in tomato flavor. In the present study, we found that refrigeration caused quantitative (decrease in area) and qualitative modifications in the aroma volatiles from 6 d of storage on. Among the main detected changes, an increase of the ratio 3-methylbutanal/3-methylbutanol and hexanal/hexanol as well as an increase in trans-3-hexenol levels were observed. These alterations can be explained by a decrease in ADH enzyme activity observed from 6 d on in refrigerated stored tomato. These changes were reflected in an increase in the perception of the descriptors solvent-humidity and medicinal and in a decrease in the descriptor lemon tea. Solvent-humidity was the only descriptor that showed a linear positive correlation with its associated volatile trans-3-hexenol, also, this volatile presented the highest correlation with the descriptor medicinal. The increase in trans-3-hexenol levels during refrigerated storage of tomato fruit and its correlation with changes in the perception of several descriptors suggest that this volatile might be used as an indicator of the effect of low temperatures in the modification of tomato aroma in the variety 7705.

The range suggested for refrigerated storage of light red tomato is 10 to 12.5 °C (Suslow, and Cantwell, 2006). Since we observed changes in aroma profile that were perceived by a trained panel at 6 d of storage at 10 °C, we recommend to evaluate the effect of refrigerated storage at 12.5 °C on the sensory quality of

tomato fruit in order to determine if this temperature could maintain an overall satisfactory quality for longer periods.

Acknowledgements

This research was partially supported by UAM and PROMEP Red CA (UAM-I, UNACH and UC DAVIS) and PROMEP (No.34775). We also thank UAM and CONACYT (No. 193037) for their financial support to Fernando Díaz de León-Sánchez during his Ph.D. studies (PNP Experimental Biology Program). This work is part of F. Díaz de León PhD dissertation.

References

- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Moshonas, M.G., 1991. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116, 265-269.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., Schuch, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35, 1013-1021.
- Baldwin, E.A., Goodner, K., Plotto, A., Pritchett, K., Einstein, M., 2004. Effect of volatiles and their concentration on perception of tomato descriptors. *J. Food Sci.* 69, S310-S318.
- Bezman, Y., Mayer, F., Takeoka, G.R., Buttery, R.G., Ben-Oliel, G., Rabinowitch, H.D., Naim, M., 2003. Differential effects of tomato (*Lycopersicon esculentum*

- Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51, 722-726.
- Boukobza, F., Taylor, A.J., 2002. Effect of postharvest treatment on flavour volatiles of tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 25, 321-331.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bramley, P.M., 2000. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 54, 233-236.
- Bruhn, C.M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., Riley, A., Thurber, D., Williamson, E., 1991. Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries and tomatoes. *J. Food Qual.* 14, 187-195.
- Buescher, R.W., 1975. Organic acid and sugar levels in tomato pericarp as influenced by storage at low temperature. *HortScience* 10, 158-159.
- Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C., 1987. Fresh tomato aroma volatiles: A quantitative study. *J. Agric. Food Chem.* 35, 540-544.
- Buttery, R.G., 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. In Acree T.E., Teranishi, R. (Eds.), *Flavor science, Sensible principle and techniques*. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 259-286.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., 1993. Volatile components of tomato fruit and plant parts: Relationship and biogenesis. In Teranishi, R., Buttery, R.G., Sugisawa, H.

- (Eds.), Bioactive volatile compounds from plants: ACS Symposium Series No. 525. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 23-24.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., Buret, M., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor. Appl. Genet.* 102, 273-283.
- Causse, M., Buret, M., Robini, K., Verschave, P., 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *J. Food Sci.* 68, 2342-2349.
- Chen, A.-R.S., Chase, T., 1993. Alcohol dehydrogenase 2 and pyruvate decarboxylase induction in ripening and hypoxic tomato fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 31, 875-885.
- Ellinger, S., Ellinger, J., Stehle, P., 2006. Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention of a prostate cancer: do we have the evidence from intervention. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 9, 722-727.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, Lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 317-331.
- Giovannucci, E., 2005. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. *J. Nutr.* 135, 2030S-2031S.
- Harmon, A.D., 1997. Solid-Phase Microextraction for the analysis of flavors. In: Marsili, R. (Ed.). *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Kader, A.A., Morris, L.L., Stevens, M.A., Albright-Holton, M., 1978. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103, 6-13.

- Kader, A.A., 2003. A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). HortScience 38, 1004-1008.
- Kader, A.A., 2008. Perspective flavor quality of fruits and vegetables. J. Sci. Food Agric. 88, 1863-1868.
- Longhurst, T.J., Tung, H.F., Brady, C.J., 1990. Developmental regulation of the expression of alcohol dehydrogenase in ripening tomato fruits. J. Food Biochem. 14, 421-433.
- Lyons, J.M., Raison, J.K., 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. Plant Physiol. 45, 386-389.
- Maul, F., Sargent, S.A., Balaban, M.O., Baldwin, E.A., Huber, D.J., Sims, C.A., 1998. Aroma volatile profiles from ripe tomatoes are influenced by physiological maturity at harvest: an application for electronic nose technology. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123, 1094-1101.
- Maul, F., Sargent, S.A., Sims, C.A., Baldwin, E.A., Balaban, M.O., Huber, D.J., 2000. Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. J. Food Sci. 65, 1228-1237.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428.
- Moretti, C.L., Baldwin, E.A., Sargent, S.A., Huber, D.J., 2002. Internal bruising alters aroma volatile profiles in tomato fruit tissues. HortScience 37, 378-382.
- Pelayo, C., Ebeler, S.E., Kader, A.A., 2005. Cultivar and harvest date effects on flavor and other quality attributes of California strawberries. J. Food Qual. 28, 67-86.

- Pelayo-Zaldívar, C., Ben-Abda, J., Ebeler, S.E., Kader, A.A., 2007. Quality and chemical changes associated with flavor of 'Camarosa' strawberries in response to a CO₂-enriched atmosphere. *HortScience* 42, 299-303.
- Prestage, S., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J., Lee, E., Speirs, J., Schuch, W., 1999. Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *J. Sci. Food Agric.* 79, 131-136.
- Ruíz, J.J., Alonso, A., García-Martínez, S., Valero, M., Blasco, P., Ruíz-Bevia, F., 2005. Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J. Sci. Food Agric.* 85, 54-60.
- Sanz, C., Olias, J.M., Perez, A.G., 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Barberan Tomas F.A., Robins R.J. (Eds.), *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Proc. of Phytochemical Society of Europe, Vol. 41. Clarendon Press, Oxford, pp. 125-155.
- Sieso, V., Nicolas, M., Seck, S., Crouzet, J., 1976. Constituants volatils de la tomate: mise en evidence et formation par voie enzymatique du trans-hexene-2-ol. *Agr. Biol. Chem.* 40, 2349-2353.
- Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Scott, N.S., Loveys, B., Schuch, W., 1998. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol.* 117, 1047-1058.
- Stern, D.J., Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L., Scott, K., Cantwell, M., 1994. Effect of storage and ripening on fresh tomato quality, Part I. *Food Chem.* 49, 225-231.

- Stone, H., Siedel, J.L., 2004. Sensory evaluation practices. Elsevier-Academic Press, Redwood city, CA, USA.
- Suslow, T.V., Cantwell, M., 2006. Tomato Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Technology Research and Information Center University of California, Davis, CA 95616.
<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Veg/tomato.shtml>
- Tandon, K.S., Baldwin, E.A., Shewfelt, R.L., 2000. Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill) as affected by medium of evaluation. Postharvest Biol. Technol. 20, 261-268.
- Tandon, K.S., Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewfelt, R.L., 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. J. Food Sci. 68, 2366-2371.
- Todd, J.F., Paliyath, G., Thompson, J.E., 1992. Effect of chilling on the activities of lipid degrading enzymes in tomato fruit microsomal membranes. Plant Physiol. Biochem. 30, 517-522.
- Watada, A.E., Aulenbach, B.B., 1979. Chemical and sensory qualities of fresh market tomatoes. J. Food Sci. 44, 1013-1016.
- Whitaker, B.D., 1993. Lipid changes in microsomes and crude plastid fractions during storage of tomato fruits at chilling and nonchilling temperatures. Phytochemistry 32, 265-271.
- Yilmaz, E., 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. Turk. J. Agric. For. 25, 149-155.

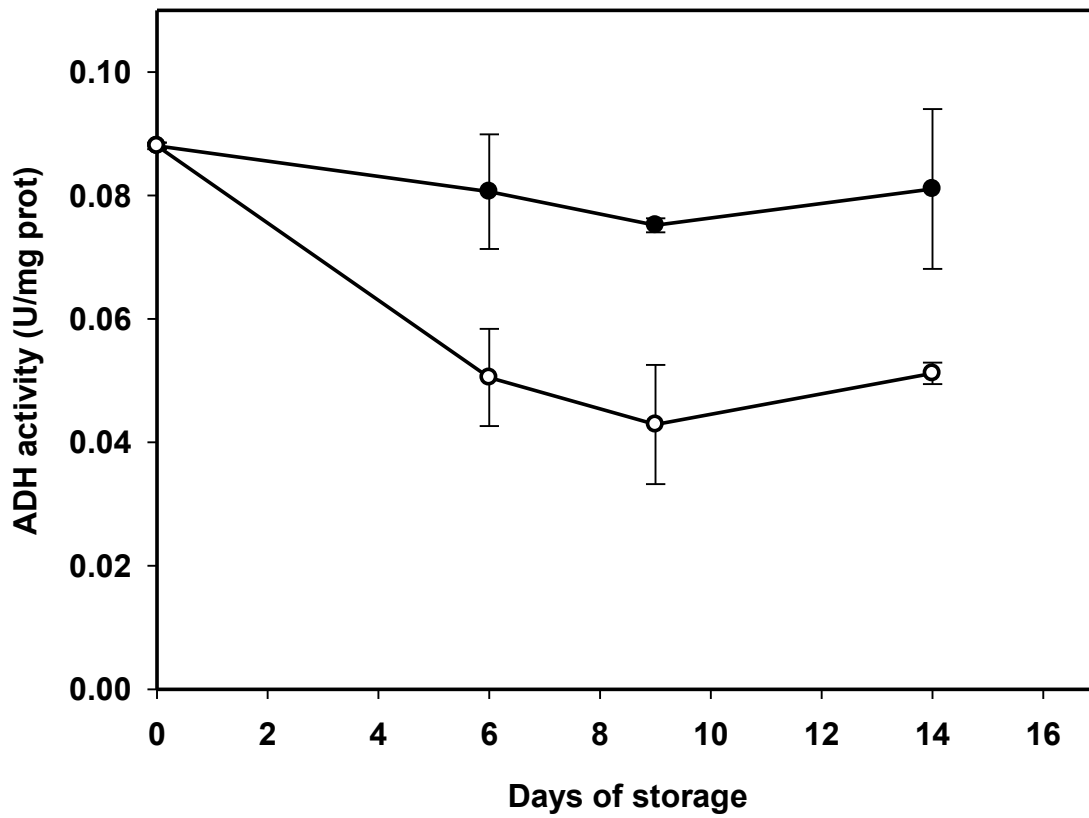


Fig. 1. ADH activity in tomato '7705' stored at (•) 20 °C and (○) 10 °C. Values are the average of three replicates. The vertical lines are standard errors.

Table 1
 Descriptors for tomato aroma generated by the trained panel, volatile
 compounds associated with them and the concentrations used in this study

Descriptor	Volatile compound	Concentration (ppm)	
		High	medium
Lemon tea	linalool	40	20
Medicinal	guaiacol	20	10
Green apple	hexanal	40	20
Almond oil	trans-2-hexenal	20	10
Herbaceous	2-isobutylthiazole	20	10
Floral-herbal	hexanol	40	20
Citrus fruits	geranylacetone	20	10
Solvent-humidity	trans-3-hexenol	80	40
Green tomato	cis-3-hexenol	40	20
Vinegary	3-methylbutanol	160	80
Rancid oil	3-methylbutanal	40	20

Table 2

Chemical analysis and quality attributes of tomato fruit '7705' stored at two different temperatures

Storage temperature	Days of storage	SSC (%)	TA (%)	Reducing sugars (%)	Sugar/Acid ratio	Texture (N)	L*	C*	h
	0	5.00 ^a	0.612 ^a	3.19 ^a	5.21	25.56 ^a	42.22 ^a	43.27 ^a	43.78 ^a
10 °C	6	4.83 ^a	0.683 ^a	2.83 ^a	4.14	23.80 ^a	43.35 ^a	43.17 ^a	43.64 ^a
	9	4.92 ^a	0.615 ^a	2.70 ^b	4.39	25.45 ^a	43.23 ^a	45.25 ^b	42.57 ^a
	14	4.90 ^a	0.695 ^a	2.60 ^b	3.74	22.69 ^a	42.03 ^a	47.63 ^c	42.32 ^a
	20	4.33 ^b	0.589 ^a	2.54 ^b	4.31	21.10 ^a	41.12 ^a	49.19 ^c	42.79 ^a
20 °C	6	4.97 ^a	0.655 ^a	3.48 ^a	5.31	28.61 ^a	38.44 ^b	40.00 ^d	37.04 ^b
	9	5.07 ^a	0.575 ^a	3.40 ^a	5.91	15.26 ^b	38.06 ^b	39.88 ^d	36.87 ^b
	14	5.00 ^a	0.478 ^b	3.50 ^a	7.32	11.41 ^b	37.25 ^b	40.85 ^d	37.10 ^b

Average of three replicates. Values followed by the same letter in each column are not significantly different according to the Tukey's multiple comparison test ($\alpha=0.05$).

Table 3
 Changes in five aroma volatile compounds derived from different metabolic pathways in tomato fruit '7705' stored at two temperatures

Storage temperature	Days of storage	3-methylbutanal ¹	3-methylbutanol ¹	Linalool ²	Geranylacetone ³	Guaiacol ⁴
	0	20157 a	402459 a	23814 a	6626 a	18051 a
10 °C	6	21289 a	344916 a	12759 b	4387 b	15813 a
	9	30511 b	254875 b	13091 b	825 c	11542 a
	14	33292 b	236105 b	18708 c	Nd	14383 a
	20	35202 b	205605 b	18238 c	Nd	16537 a
20 °C	6	20114 a	296077 b	11052 b	1864 c	16490 a
	9	20455 a	255648 b	13352 b	1630 c	8043 c
	14	14836 c	251665 b	11840 b	Nd	7415 c

Values of individual compounds are in area units and correspond to the average of three replicates. Compounds derived from ¹ aminoacids; ² terpenic compound; ³ carotenoids; ⁴ lignins
 Values followed by the same letter in each column are not significantly different according to the Tukey's multiple comparison test ($\alpha=0.05$). Nd non detected.

Table 4
Changes in six aroma volatile compounds derived from lipid metabolism in tomato fruit '7705'
stored at two temperatures

Storage temperature	Days of storage	trans-2-hexenal	hexanal	hexanol	trans-3-hexenol	cis-3-hexenol	2-isobutylthiazole
	0	460804 a	1141026 a	123796 a	1373 a	369407 a	193648 a
10 °C	6	655324 b	997903 a	10888 b	772 a	74829 b	171955 a
	9	664693 b	915223 a	9672 b	1432 a	78247 b	151429 a
	14	646690 b	955218 a	9241 b	2523 b	45308 b	178975 a
	20	737004 b	1237683 a	37818 c	2945 b	104094 b	163450 a
20 °C	6	644152 b	2253143 b	13090 b	957 a	47685 b	202707 a
	9	437266 a	2048497 b	21557 c	2104 a	73011 b	163011 a
	14	419556 a	3454535 c	18905 c	708 a	39319 b	170085 a

Values of individual compounds are in area units and correspond to the average of three replicates.

Values followed by the same letter in each column are not significantly different according to the Tukey's multiple comparison test ($\alpha=0.05$).

Table 5
 Relative ratio of aldehydes/alcohols in tomato fruit stored at 10 °C

Days of Storage	Ratio 3-methylbutanal/ 3-methylbutanol	Ratio hexanal/hexanol
0	1.00	1.00
6	1.33	10.68
9	2.45	11.57
14	2.90	12.37

Ratio values at 0 days were considered as 1.

Table 6

Sensory scores in five aroma descriptors of tomato fruit '7705' stored at two temperatures

Storage temperature	Days of storage	Rancid oil	Vinegary	Lemon tea	Citrus fruits	Medicinal
10 °C	0 ¹	2.48 a	2.87 a	2.67 a	3.23 a	2.95 a
	6 ²	2.55 a	2.82 a	2.35 a	3.28 a	3.58 b
	9 ³	3.46 a	2.94 a	1.59 b	2.87 a	3.72 b
	14 ³	2.12 a	3.13 a	1.86 b	2.58 a	2.47 a
20 °C	20 ⁴	3.04 a	2.34 a	1.77 b	2.45 a	2.76 a
	6 ²	3.08 a	3.36 a	1.99 a	3.41 a	2.38 a
	9 ³	4.12 b	3.46 a	1.33 b	3.18 a	3.31 a
	14 ³	2.12 a	3.45 a	2.81 a	3.52 a	2.69 a

Values followed by the same letter in each column are not significantly different according to the

Tukey's multiple comparison test ($\alpha=0.05$). Two way ANOVA with ¹40, ²63, ³51, ⁴38 error degrees of freedom.

Table 7
Sensory scores in six aroma descriptors of tomato fruit '7705' stored at two temperatures

Storage temperature	Days of storage	Almond oil	Green apple	Floral-herbal	Solvent-humidity	Green tomato	Herbaceous
10 °C	0 ¹	2.95 a	3.14 a	3.01 a	2.93 a	3.76 a	2.90 a
	6 ²	2.32 a	3.13 a	3.32 a	4.16 b	4.33 a	3.89 a
	9 ³	2.22 a	3.12 a	2.61 a	5.88 b	3.59 a	3.17 a
	14 ³	2.38 a	2.88 a	2.31 a	4.78 b	3.77 a	3.25 a
20 °C	20 ⁴	2.15 b	2.67 a	2.47 a	5.37 b	3.81 a	3.40 a
	6 ²	2.71 a	2.92 a	3.16 a	2.76 a	3.53 a	2.85 a
	9 ³	2.47 a	3.37 a	2.62 a	3.47 a	2.85 a	2.88 a
	14 ³	3.29 a	2.63 a	2.56 a	3.02 a	3.63 a	2.57 a

Values followed by the same letter in each column are not significantly different according to the Tukey's multiple comparison test ($\alpha=0.05$). Two way ANOVA with ¹40, ²63, ³51, ⁴38 error degrees of freedom.

Table 8
 Highest correlation coefficients for selected descriptors against aroma compounds
 of tomato '7705'

Sensory Descriptor	Storage temperatura	
	10 °C	20 °C
Solvent-humidity	trans-3-hexenol r= 0.83 P-value= 0.07	2-isobutylthiazole r= -0.88 P-value= 0.12
Almond oil	trans-2-hexenal r= -0.97 P-value= 0.005	3-methylbutanal r= -0.85 P-value= 0.14
Lemon tea	3-methylbutanol r=0.93 P-value= 0.02	linalool. r= 0.37 P-value= 0.63
	Geranylacetone r= 0.95 P-value= 0.01	
	3-methylbutanal r= -0.89 P-value= 0.04	
Medicinal	trans-3-hexenol r=-0.78 P-value= 0.10	trans-3-hexenol r=-0.91 P-value= 0.12
Rancid oil	2-isobutylthiazole r= -0.82 P-value= 0.09	3-methylbutanal r= 0.67 P-value= 0.33

ANEXO 3

CUESTIONARIO 1

Ejemplo de un cuestionario de una prueba discriminativa dúo-trío y descriptiva semicuantitativa aplicada para evaluar el aroma de jitomate

Prueba discriminativa duo-trío y cuantificación de descriptores en jitomate

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Compare las siguientes 2 muestras problema de jitomate, contra la referencia.

Para cada muestra problema (jitomate completo), indique si su aroma es igual o diferente a la referencia.

288 _____

563 _____

Así mismo trate de asignar en cada jitomate completo la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

- 0 sin olor
- X olor bajo
- XX olor de nivel medio
- XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	288	563	referencia
1	aceite rancio			
2	avinagrado			
3	humedad-solvente			
4	floral-vegetal			
5	Té limón			
6	medicinal			
7	manzana verde			
8	aceite de almendras			
9	herbáceo			
10	cítricos			
11	jitomate verde			

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

DEVUELVA LOS JITOMATES AL COORDINADOR PARA QUE LE PROPORCIONE OTROS.

Posteriormente al partirlos diga si su aroma es igual o diferente a la referencia.

723 _____

519 _____

De igual forma, trate de asignar en cada jitomate partido, la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello, compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

- 0 sin olor
- X olor bajo
- XX olor de nivel medio
- XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	723	519	referencia
1	aceite rancio			
2	avinagrado			
3	humedad-solvente			
4	floral-vegetal			
5	té limón			
6	medicinal			
7	manzana verde			
8	aceite de almendras			
9	herbáceo			
10	cítricos			
11	jitomate verde			

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

Finalmente al degustar el jitomate trate de asignar en cada caso, la intensidad del aroma para cada uno de los descriptores asignados. Para ello, compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

- 0 sin olor
- X olor bajo

XX olor de nivel medio

XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	723	519	referencia
1	aceite rancio			
2	avinagrado			
3	humedad-solvente			
4	floral-vegetal			
5	té limón			
6	medicinal			
7	manzana verde			
8	aceite de almendras			
9	herbáceo			
10	cítricos			
11	jitomate verde			

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

Cuestionario 2

Ejemplo de un cuestionario de una prueba discriminativa a no a, y descriptiva semicuantitativa aplicada para evaluar el aroma de jitomate

Prueba A NO A y de cuantificación de descriptores en jitomate

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Compare las siguientes 3 muestras problema de jitomate, contra la referencia.

Para cada muestra problema (jitomate completo), indique si su aroma es igual o diferente a la referencia.

849 _____

467 _____

712 _____

Asimismo trate de asignar en cada jitomate completo la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello, compare las muestras entre sí. Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

0 sin olor
X olor bajo
XX olor de nivel medio
XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	849	467	712	referencia
1	aceite rancio				
2	avinagrado				
3	humedad-solvente				
4	floral-vegetal				
5	Té limón				
6	medicinal				
7	manzana verde				
8	aceite de almendras				
9	herbáceo				
10	cítricos				
11	jitomate verde				

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

DEVUELVA LOS JITOMATES AL COORDINADOR PARA QUE LE PROPORCIONE OTROS.

Posteriormente al partarlos diga si su aroma es igual o diferente a la referencia.

184 _____
 677 _____
 286 _____

De igual forma trate de asignar en cada jitomate partido, la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

- 0 sin olor
- X olor bajo
- XX olor de nivel medio
- XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	184	677	286	referencia
1	aceite rancio				
2	avinagrado				
3	humedad-solvente				
4	floral-vegetal				
5	té limón				
6	medicinal				
7	manzana verde				
8	aceite de almendras				
9	herbáceo				
10	cítricos				
11	jitomate verde				

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores.

Finalmente, al degustar el jitomate trate de asignar en cada caso, la intensidad del aroma para cada uno de los descriptores asignados. Para ello, compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente nomenclatura según considere la intensidad de su aroma

0 sin olor
 X olor bajo
 XX olor de nivel medio
 XXX olor fuerte

Considerando que el 0 significa carencia de olor y xxx el mayor olor

	Descriptores	184	677	286	referencia
1	aceite rancio				
2	avinagrado				
3	humedad-solvente				
4	floral-vegetal				
5	té limón				
6	medicinal				
7	manzana verde				
8	aceite de almendras				
9	herbáceo				
10	cítricos				
11	jitomate verde				

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores.

Cuestionario 3

Ejemplo de un cuestionario de una prueba descriptiva cuantitativa aplicada para evaluar el aroma de jitomate

Prueba de cuantificación de descriptores en jitomate

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Compare las siguientes 3 muestras problema de jitomate, contra la referencia.

Para cada muestra problema (jitomate completo), indique si su aroma es igual o diferente a la referencia.

858 _____

194 _____

372 _____

Así mismo trate de asignar en cada jitomate completo la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello compare las muestras entre sí. Abra los frascos y trate de asignar en el jitomate completo la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados.

Utilice la siguiente escala, tratando de colocar sobre la recta una marca donde considere que se encuentra la intensidad del olor de cada uno de estos descriptores en el aroma del jitomate.

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

te de limón

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

medicinal

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

manzana verde

referencia | _____ | _____ |
858 | _____ | _____ |
194 | _____ | _____ |
372 | _____ | _____ |
ausente | _____ | máximo

aceite de almendras

referencia | _____ | _____ |
858 | _____ | _____ |
194 | _____ | _____ |
372 | _____ | _____ |
ausente | _____ | máximo

floral-vegetal

referencia | _____ | _____ |
858 | _____ | _____ |
194 | _____ | _____ |
372 | _____ | _____ |
ausente | _____ | máximo

cítricos

referencia | _____ | _____ |
858 | _____ | _____ |
194 | _____ | _____ |
372 | _____ | _____ |
ausente | _____ | máximo

herbáceo

referencia | _____ | _____ |
858 | _____ | _____ |
194 | _____ | _____ |
372 | _____ | _____ |
ausente | _____ | máximo

Humedad-solvente

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

jitomate verde

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

avinagrado

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

aceite rancio

referencia	_____ _____
858	_____ _____
194	_____ _____
372	_____ _____
ausente	máximo

En caso de necesitarlo, solicite a los coordinadores del panel un juego de estándares de los descriptores

DEVUELVA LOS JITOMATES AL COORDINADOR PARA QUE LE PROPORCIONE OTROS.

Jitomate partido

Al partir los nuevos jitomates diga si su aroma es igual o diferente a la referencia.

919 _____
821 _____
825 _____

De igual forma trate de asignar en cada jitomate partido, la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello compare las muestras entre sí.

Utilice la siguiente escala, tratando de colocar sobre la recta una marca donde considere que se encuentra la intensidad del olor de cada uno de estos descriptores en el aroma del jitomate.

te de limón

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

medicinal

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

manzana verde

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

aceite de almendras

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

floral-vegetal

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

cítricos

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

herbáceo

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

humedad solvente

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

jitomate verde

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

avinagrado

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

aceite rancio

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

Jitomate degustado

Finalmente, al degustar el jitomate trate de asignar en cada jitomate, la intensidad del aroma de cada uno de los descriptores asignados. Para ello compare las muestras entre si.

Utilice la siguiente escala, tratando de colocar sobre la recta una marca donde considere que se encuentra la intensidad del olor de cada uno de estos descriptores en el aroma del jitomate.

te de limón

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

medicinal

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

manzana verde

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

aceite de almendras

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

floral-vegetal

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
Ausente	Máximo

cítricos

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

herbáceo

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

humedad solvente

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

jitomate verde

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

avinagrado

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

aceite rancio

referencia	_____ _____
919	_____ _____
821	_____ _____
825	_____ _____
ausente	máximo

Le gusta el aroma y sabor de todos los jitomates de la prueba

Si _____

No _____ ¿Cuál no le agrada

¿Los compraría en el supermercado?

Sí

No

¿Por qué?

Prueba de preferencia en jitomate

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Analice el aroma y sabor de las muestras de jitomate, denominadas 1 y 2.

Abra uno a uno los contenedores de las muestras, inhale el aroma, parta el jitomate y vuelva a inhalar su aroma, finalmente deguste el jitomate

Le gusta el aroma y sabor de las muestras 1 y 2

Sí _____

No _____ ¿por qué?

¿Las compraría en el supermercado?

Sí

No

¿Por qué?