

Control de oxidación de vinos blancos obtenidos bajo condiciones tropicales

Oxidation control of white wines obtained under tropical conditions

M.N. Berradre R., G.B. Páez R., E.A. Ramones B., Z.M. Mármol P. y M. Ferrer J. R.

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4001-A, estado Zulia, Venezuela.

Resumen

Se estudió el efecto de tratamientos térmicos aplicados a un mosto de uva, *Vitis vinifera* var. *malvasía* y el tiempo de almacenamiento de los vinos blancos obtenidos sobre el contenido de catequinas y fenoles totales para controlar la oxidación en estos vinos. Se aplicaron a los mostos los tratamientos de 45°C, 55°C, 65°C, y 75°C durante 2 y 5 minutos. El contenido de catequinas se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm y el contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados obtenidos fueron analizados a través del diseño de mediciones repetidas para un nivel de significancia del 1% con un efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento y de las temperaturas aplicadas sobre el contenido de catequinas y fenoles totales, mientras que el tiempo de duración del tratamiento térmico no afectó dichos factores. Los vinos obtenidos con el tratamiento térmico de 55°C durante 2 minutos representan una combinación de tiempo-temperatura que garantiza la destrucción de la polifenoloxidasas y además presenta bajo contenido de catequinas (1,34 mg·L⁻¹) y de fenoles totales (167,58 mg·L⁻¹), siendo éste el tratamiento térmico más adecuado para el control de la oxidación y recomendado para procesos de vinificación en el trópico.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, *malvasia*, catequinas y fenoles en vinos blancos.

Abstract

Heat treatments effects applied to the must obtained from grapes (*Vitis vinifera* cv. *Malvasia*) and storage time of wine obtained on the total catechin content and total phenols for the oxidation control of this wine was studied.

The heat treatments of 45°C, 55°C, 65°C and 75°C were applied during 2 and 5 minutes. Catechin content was determined by spectrophotometry to wavelength of 500 nm and the total content of phenols by Folin-Ciocalteu's method to wavelength of 765 nm. Results obtained were analyzed through design of repeated measurements to a level of significance of 1% with a highly significant effect of the time of storage and of the temperatures applied on the content of total catechin and phenols, while the duration time of heat treatment did not affect these factors. The wines obtained with the heat treatment of 55°C during 2 minutes represented a time-temperature combination that destroy the polyphenols oxydase and moreover less amount of catechins (1.34 mg·L⁻¹) and total phenols (167.58 mg·L⁻¹), being the heat treatments most adequate for oxidation control and recommended for vinification process at tropic.

Key words: *Vitis vinifera*, *malvasía*, catechin, phenols, white wines.

Introducción

El vino es el producto de la fermentación del mosto de uvas por células de levaduras, su característica o calidad organoléptica está íntimamente relacionada al buen manejo de la cosecha y cuidado del mosto desde su obtención, pasando por las diversas etapas de vinificación y almacenamiento antes de su comercialización.

Uno de los principales problemas en la elaboración del vino blanco es el contacto del mosto y del vino con el oxígeno del aire en las diversas secciones de elaboración. Resulta difícil evitar este contacto durante las etapas de procesamiento, conservación y almacenamiento (8). El oxígeno desnaturaliza el aroma, destruye el afrutado y oscurece el color.

Durante la vinificación, las oxidaciones son más graves porque el mosto es más sensible que el vino y más difícil de proteger, debido a que los sistemas enzimáticos siguen intactos, mientras que en el vino la oxidación se da por oxidación no enzimática. La oxidación de la vendi-

Introduction

Wine is a product resulting of fermentation of grape must by yeast cells; its characteristic and/or organoleptic quality is in relation to the good management of harvest and carefulness of must from the crop beginning, passing through different vinification and storage stages before commercialization.

One of principal problems in white wine elaboration is the must and wine contact with air oxygen in different elaboration sections. It is difficult to avoid this contact during processing, conservation and storage stages (8). Oxygen denaturalize aroma, fruited is destroyed and color is obscured.

During vinification, oxidations are more severe because must is more sensitive than wine and more difficult to protect, due to the enzymatic systems continue intact whereas in wine, oxidation is no enzymatic. Oxidation of vintage and different must fractions is more accentuated by oxydase presence. Grapes has a high

mia estrujada y de las diferentes fracciones del mosto es mucho más acentuada por la presencia de oxidasas. Las uvas presentan alta actividad de polifenoloxidasas y el oscurecimiento enzimático ocurre rápidamente en la baya dañada o durante la trituración de uvas frescas para jugos y vinos (2). La indeseable reacción de oscurecimiento está asociada a la enzima polifenoloxidasa (PPO) (monofenol, dihidroxi-L-fenilalanina) cuyo número código es (E.C. 1.14.18.1) (13). La enzima cataliza dos distintos tipos de reacciones que involucran al oxígeno molecular, llamadas: a) La o-hidroxilación de monofenoles a o-difenoles o actividad de la cresolasa y b) la subsecuente oxidación de o-difenoles a o-quinonas o actividad de la catecolasa (10, 14). El oxígeno para la hidroxilación de monofenoles para dar o-difenoles viene directamente a partir del O_2 no a partir de agua. Un átomo de oxígeno es incorporado dentro del fenol, y el otro dentro del agua formada. Así, la polifenoloxidasa actúa como una monooxygenasa en esta reacción (2). El mecanismo de oxidación de o-difenoles por la polifenoloxidasa no es conocido con certeza, sin embargo, en este mecanismo existen evidencias de que no son formados intermediarios radicales. Investigaciones sobre la interacción del O_2 y el o-difenol para la enzima indica que el O_2 reacciona primero. Este mecanismo es realizado sobre mecanismo Bi Bi (2). Las polifenoloxidasas que actúan sobre las sustancias fenólicas provocando modificaciones intensas, en casos extremos, llegan a producir la quiebra

activity of polyphenoloxylase and the enzymatic darkening happens in a quickly way in the damaged berry or during fresh grapes grinding for juices and wines (2). Reaction undesirable of darkening associated with the polyphenoloxylase (PPO) (monophenols, dihydroxy-L-phenylalanine) with code number E.C.1.14.18.1 (13). Enzyme catalyzes two different reaction kinds that involve molecular oxygen calls: a) monophenols o-hydroxylation to o-dyphenols or cresolase activity and b) Oxidation subsequent of o-dyphenols to o-quinones or catecholase activity (10, 14). Oxygen for mono phenols hydroxylation for giving o-dyphenols comes directly from O_2 , not from water. An oxygen atom is incorporated inside phenol and the other one inside of formed water. Thus, polyphenoloxylase acts like a mono oxygenase in this reaction (2). Oxidation mechanism of o-dyphenols by phenoloxylase is not certainly known, however, in this mechanism there are evidences that they are not formed radical intermediaries. Researches about enzyme interaction of O_2 and o-diphenol indicate that O_2 react firstly. This mechanism is accomplished on mechanism Bi Bi (2). Polyphenoloxylase acts on phenolic substances causing intense modifications, in extreme cases, produce oxydase breaking, with acre and bitter substances formation. Substances responsible of aroma formation of must are oxydases too (8).

Color darkening during wine production stage is caused by

oxidásica, la formación de sustancias acres y amargas. Las sustancias responsables del aroma del mosto son también oxidadas (8).

El oscurecimiento del color durante las etapas de producción del vino resulta esencialmente a partir de reacciones químicas que envuelven compuestos fenólicos, particularmente derivados del flavan 3-ol (catequinas) (9).

Los cambios más significativos, producidos por la oxidación de mostos y vinos, son la polimerización de fenoles y la generación de acetaldehído, este hecho repercute básicamente en el aspecto físico del producto ya que causa un cambio radical en el color y en el aroma del mosto, lo que implica la disminución de la calidad del producto final (2).

Hasta ahora, el oscurecimiento ha sido considerado principalmente debido al empobrecimiento de las características sensoriales y a la reducción de la vida del vino, sin embargo, los aspectos nutricionales del oscurecimiento deben también tenerse presentes. La oxidación de los fenoles, conduce a la reducción de la habilidad de oxidación del vino y a una reducción de la disponibilidad de aminoácidos esenciales importantes como: lisina, triptófano, histidina, cisteína y metionina, por la formación de compuestos que combinan fenoles y proteínas oxidadas en el tracto duodenal del aparato digestivo (10).

Algunos métodos utilizados para prevenir el contacto del oxígeno con el vino son: antioxidantes y químicos, tratamientos térmicos y remoción de polifenoles que han sido propuestos para prevenir el oscurecimiento de los vinos blancos (12).

chemical reactions that involves phenolic compound derived from flavones 3-ol (catechin) (9).

The most significative changes produced by must oxidation are phenol polymerization and acetaldehyde generation, which have an influence on physical aspect of product because it causes a radical change on color and must aroma that implies quality of final product decreasing (2).

So far, darkening has been taking into account due to the impoverishment of sensorial characteristics and to the reduction of wine life, however nutritional aspects of darkening must be considered. Phenol oxidation causes the ability reduction of wine oxidation and amine acids availability like: lysine; cysteine, triptophane, hystidine and methyonine, by compounds formation that combines phenols and oxydate proteins in the duodenal tract of digestive apparatus (10).

Some methods used for preventing the oxygen contact with wine are: antioxidants and chemicals, thermic treatments and polyphenols removing proposed for preventing white wine darkening (12).

In this study were evaluated the thermic treatments applying to must at different times for inhibiting the polyphenoloxydase enzyme activity and controlling the must and white wines oxidation produced under tropical conditions.

Materials and methods

Grape must:

60 L of grape must (*Vitis vinifera* var. *Malvasia*) was obtained from Centro Viticola, Zulia state, with a

En este trabajo se evaluó la aplicación de tratamientos térmicos al mosto a diferentes tiempos que permitan inhibir la actividad de la enzima polifenoloxidasas y controlar la oxidación de mostos y vinos blancos producidos bajo condiciones tropicales.

Materiales y métodos

Mosto de Uva

Se obtuvo 60 L de mosto de uva *Vitis vinifera* var. *malvasía* del Centro Vitícola del Estado Zulia, con una concentración de $0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de metabisulfito de sodio usado como preservante biológico selectivo y antioxidante.

Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados en los diversos análisis fueron de grado reactivo.

Organismo

Se utilizó el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 4921) proveniente de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Se obtuvo en estado liofilizado y fue debidamente rehidratado y activado en cuñas de agar nutritivo de acuerdo a especificaciones del proveedor (5).

Número de muestras.

Se tomaron 18 muestras representativas de mosto (0,90 L cada una) y se envasaron en vasijas de fermentación de 1,3 L de capacidad previamente esterilizadas.

Pie de cuba

Se utilizó 1,6 L de mosto en una vasija de 2 L para preparar el pie de cuba con una concentración de sólidos disueltos en el mosto de 20 °Brix,

concentration of $0.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of sodium metabisulfate used like biological preservative selective and antioxidant.

Reagents:

All chemical reagents used in different analysis were of reactive way.

Organism:

Saccharomyces cerevisiae (ATCC 4921) provided by American Type Culture Collection (Rockville, MD; USA) in a lyophilized state was used, rehydrated and activated in an appropriate way in a wedge of nutritive agar, according to purveyed specifications (5).

Samples number:

18 representatives samples of must were taken (0.90 L each) and were packed in fermentation recipient of 1.3L of capacity sterilized previously.

"Pie de Cuba":

1,6 L of must in a recipient of 2 L was used for preparing the "Pie de Cuba" with a dissolved solids concentration in must of 20°Brix, supplemented with $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of ammonium phosphate (FISHER, New Jersey, USA). Must was heated by agitation to a temperature of 40°C. Immediately it was added $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of yeast and it was agitated until well mixed. Cotton stopper and it was incubated during 24 hours to 25°C.

Thermic treatments applied to must and fermentation process for elaborating white wine:

Thermic treatments of 45°C, 55°C, 65°C and 75°C during 2 and 5 minutes were applied to the must. Two replications per treatment and two duplicates of each replicate were

suplementado con 0,2 g.L⁻¹ de fosfato de amonio (FISHER, New Jersey, USA). El mosto fue calentado con agitación hasta una temperatura de 40°C, inmediatamente se le agregó 0,3 g.L⁻¹ de levadura y se agitó hasta que se mezcló bien. Se le colocó un tapón de algodón y se incubó durante 24 horas a 25°C.

Tratamientos térmicos aplicados al mosto y proceso de fermentación para elaboración del vino blanco.

Se aplicó a los mostos los tratamientos térmicos de 45°C, 55°C, 65°C y 75°C durante 2 y 5 minutos. Se hizo 2 réplicas por tratamiento y dos duplicados de cada réplica. El blanco correspondió a dos mostos de igual volumen y concentración sin tratamientos.

Las temperaturas aplicadas para los tratamientos fue graduada en un baño térmico modelo Barnstead•Thermolyne⁻¹ (Duburke, Iowa, USA) y cada una de las botellas con muestras de mosto, se trató a las diversas temperaturas y tiempos correspondientes.

Una vez aplicado el tratamiento térmico se le agregó 0,10 L de pie de cuba a cada una de las botellas conteniendo 0,90 L de mosto para un volumen total de 1 L.

Las botellas fueron envueltas en papel aluminio con el fin de que la luz no interfiriera y se dejaron en reposo durante todo el periodo de fermentación (15 días).

A lo largo del proceso de fermentación se midieron los °Brix por refractometría en un refractómetro marca Boush Lomb, para corroborar la transformación de los azúcares en alcohol y conocer el tiempo de finali-

made. Control corresponded to 2 must of same volume and concentration without treatments.

Temperatures applied for treatments was graduated in a thermic bath model Barnstead/Thermolyne (Duburke, Iowa, USA) and each of bottles with must samples was treated at different temperatures and corresponding times.

Once chemical treatment was applied, 0.10 L "Pie de Cuba" it was added to each bottles containing 0.90 L of must for a total volume of 1 L.

Bottles were involved in aluminum paper with the purpose of light do not interfere and they were leaving at rest during all fermentation process (15 days).

During fermentation process °Brix by refractometry were measured in a refractometer Boush Lomb, by checking sugar transformation to alcohol and by knowing ending time of fermentation process and wine obtain.

Wine obtained were classified by a positive filtration process through a filter Gelman Sciences (Ann Arbor, Michigan, USA) by using nitrogenous like impelling gas. All wines bottles were identified.

Once the wine obtained, the alcohol present was determined like a modification of technique used by Urribarri and Soto (11), measured through a Gas chromatograph Perkin Elmer, model XL System (Norwalk, Connecticut, USA) with a capillary column marc Quadrex (New Haven, CT, USA) of 15 m length, 530 µm of intern diameter, 1 µm of film thick and stationary phase OV-225 (007-225). Operation conditions for ethanol

zación del proceso de fermentación y obtención del vino.

Los vinos obtenidos fueron clarificados por un proceso de filtración positiva a través de un filtro marca GELMAN Sciences (Ann Arbor, Michigan, USA), usando nitrógeno como gas impulsor. Todas las botellas de vino fueron debidamente identificadas.

Una vez obtenido el vino se determinó el contenido de alcohol presente en este como una modificación de la técnica utilizada por Urribarri y Soto (11), medido mediante un cromatógrafo de Gases marca Perkin Elmer, modelo XL System (Norwalk, Connecticut, USA), provisto de una columna capilar marca Quadrex (New Haven, CT, USA) de 15 m de longitud, 530 μm de diámetro interno, 1 μm de espesor de película y fase estacionaria OV-225 (007-225). Las condiciones de operación para la medición de etanol fueron: Presión del gas de arrastre, (He) = 7.5 psi; Temperatura de inyección = 70°C; Temperatura de la columna = 110°C; Temperatura del detector, 250°C; tiempo de la corrida 3 min.

Fenoles

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu procedimiento desarrollado por Singleton y Rossi (1), a través de un espectrofotómetro de luz visible y UV, CARY 50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (1).

Contenido de catequinas

El contenido de catequinas fue determinado colorimétricamente mediante el procedimiento desarrollado por Ponpei y Petri (1) y es una varian-

measuring were: Pulling gas pressure (He) = 7.5 psi; Injection = 70°C; Column temperature = 110°C; Detector temperature = 250°C, execution time = 3 min.

Phenols

The total phenol content was determined by colorimetric model of Folin-Ciocalteu, a procedure development by Singleton and Rossi (1), through a visible light and UV spectrophotometer, CARY 50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (1).

Catechin content:

It was determined by colorimetrically through procedure developed by Ponpei and Petri (1), a variant of Rebelein (1) method, in a visible light and UV spectrophotometer, CARY 50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (1).

Calibration curves made for polyphenols and catechin content was accomplished when wine was ready (at storage wine) and after three months of storage, the calibration curve again it was made again for these analyses.

Experimental design:

It was design for exploring the best combination time-temperature applied to bottles with white grape must *var. Malvasia* that guarantee the inhibition of polyphenoloxidase, a little quantity of polyphenols and a high quantity of catechin in wine, with the purpose of controlling oxidation of wines obtained. Eight treatments were applied to the must: 1) 45°C during 2 min; 2) 45°C during 5 min; 3) 55°C during 2 min; 4) 55°C during 5 min; 5) 65°C during 2 min. 6) 65°C during 5 min; 7) 75°C during 2 min; 8) 75°C during 5 min. Each of

te del método de Rebelein (1), en un espectrofotómetro de luz visible y UV, CARY 50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (1).

Las curvas de calibración realizadas tanto para el contenido de polifenoles totales como para el contenido de catequinas se realizó una vez culminado el vino (vino sin almacenamiento) y luego de los tres meses de almacenamiento, para estos últimos análisis se realizó de nuevo la curva de calibración.

Diseño del experimento

Se diseñó el experimento para explorar la mejor combinación de tiempo-temperatura aplicada sobre las botellas con mosto de uva blanca var. *malvasía*, que garantizara la inhibición de la enzima polifenoloxidasas, menor cantidad de polifenoles y mayor cantidad de catequinas en el vino, con el fin de controlar la oxidación de los vinos obtenidos. Se aplicaron a los mostos, ocho tratamientos: 1) 45°C durante 2 minutos, 2) 45°C durante 5 minutos, 3) 55°C durante 2 minutos, 4) 55°C durante 5 minutos, 5) 65°C durante 2 minutos, 6) 65°C durante 5 minutos, 7) 75°C durante 2 minutos y 8) 75°C durante 5 minutos. Cada uno de estos tratamientos se realizó por duplicado, resultando un total de 16 botellas.

Las botellas de mostos de uva blanca var. *malvasía*, se asignaron al azar a los ocho tratamientos en un diseño totalmente aleatorizado. Un baño térmico modelo Barnstead.Thermolyne⁻¹ (Dubuke, Iowa, USA) ajustable a las temperaturas asignadas para los tratamientos fue el medio para alcanzar cada tratamiento.

Se estudió el contenido de fenoles

treatment was made in duplicate, resulting on a total of 16 bottles.

White grape var. *Malvasia* must bottles were assigned at random to eight treatments in a randomized complete design. A thermic bath model Barnstead.Thermolyne⁻¹ (Dubuke, Iowa, USA) adjustable to assigned temperatures for treatments was the way for reaching each treatment.

Total phenols and catechins content was studied at zero and three storage months through repeated measurements method.

Statistical calculation:

Results obtained were analyzed through repeated measurements design. Repeated measurements in each experimental unit proportioned information about the response variable time trend (total polyphenols and catechin) under different treatment conditions (time combination and temperature). Trends in time shows the time in which treatment units respond or the time required for treatment effects reflects on study units. It was possible the evaluation of differences between treatments tendencies (6).

These repeated measurements for eight treatments were made by duplicate, in a randomized complete in terms of inter subjects in which an experimental unit is assigned to a treatment (6).

In relation to intra subject design, it consisted on repeated measurements of total polyphenols and catechin accomplished in each bottle for zero and three months of storage (6).

totales y catequinas a los cero y tres meses de almacenamiento a través del método de mediciones repetidas.

Cálculo estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados a través del diseño de mediciones repetidas. Las mediciones repetidas en cada unidad experimental proporcionaron información sobre la tendencia en tiempo de la variable de respuesta (polifenoles totales y catequinas) bajo diferentes condiciones de tratamiento (combinaciones de tiempo y temperatura). Las tendencias en el tiempo revelaron qué tan rápido respondieron las unidades al tratamiento o durante cuánto tiempo se manifestaron los efectos del tratamiento en las unidades del estudio. Con esto también fue posible evaluar las diferencias entre las tendencias de los tratamientos (6).

Estas mediciones repetidas para ocho tratamientos se realizaron por duplicado, en un diseño totalmente aleatorizado en términos de intersujetos donde una unidad experimental se asigna a un tratamiento (6).

En cuanto al diseño intrasujetos este consistió en las mediciones repetidas de polifenoles totales y catequinas realizadas en cada botella para los cero y tres meses de almacenamiento (6).

Resultados y discusion

El contenido de etanol en los vinos blancos producidos a partir de la variedad de uva malvasía fue $9,14 \pm 0,07$ % v/v, ligeramente seco y de color amarillo verdoso, al ser comparado con vinos de 11% v/v, considerados secos de acuerdo a lo reportado por Vaimakis y Roussis (12).

Results and discussions

Ethanol content in white wine produced from *Malvasia* variety was $9.14 \pm 0.07\%$ v/v., lightly dry and yellow-green color, comparing with wines of 11% v/v, considered dries according to Vaimakis *et al.*, 1997.

Table 1 shows the catechin content in white wines treated at temperatures of 45°C, 55°C, 65°C and 75°C during 2 and 5 minutes for 0 and 3 storage months, ordered through an experimental design of repeated measurements.

It was observed an increase in catechin contents for every chemical treatments applied in white wine *var. Malvasia* must when increasing storage time for 2 and 5 minutes of treatment duration, likewise for control wine. This behavior was observed in the study accomplished by (7) in where a catechin content (mg.L^{-1}) from 6.76 ± 0.530 to 10.2 ± 0.173 , from 0 to 14 storage weeks, respectively. By comparing this result with catechin content (mg.L^{-1}) present in studied wines, the maximum value at 3 storage months product was of 1.49 ± 0.07 , for treatment of 45°C during 2 min. which indicates that wines have a lower darkening capacity due to a lower catechin content that can be degraded in a way no enzymatic. Young white wines have lower catechin concentrations that mature white wine. Increase of mono and dimer contents of compound flavone-3-ol (catechin) can be reasonably attributed to absence of wine contact with atmospheric oxygen, which permits the hydrolysis of oligomer derivatives; these

El cuadro 1, muestra el contenido de catequinas en los vinos blancos tratados a las temperaturas de 45°C, 55°C, 65°C y 75°C durante 2 y 5 minutos para 0 y 3 meses de almacenamiento ordenados a través de un diseño de experimento de mediciones repetidas.

Se observó aumento del contenido de catequinas para todos los tratamientos térmicos aplicados en los mostos de uva blanca var. *malvasía* al aumentar el tiempo de almacenamiento para 2 y 5 minutos de duración del tratamiento, así como también para el vino control, este mismo comportamiento fue observado en el estudio realizado por Mayén *et al.* (7) donde reporta un contenido de catequinas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) que va desde $6,76\pm 0,530$ hasta $10,2\pm 0,173$ de cero a catorce semanas de almacenamiento respectiva-

mente. Los compuestos se oxidan en una moderada extensión durante este anaeróbico periodo (7). El contenido de catequina muestra una tendencia creciente en el tiempo de maduración del vino. El vino tratado durante 2 min a 55°C y almacenado durante 3 meses, es el más recomendado ($1,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a pesar de tener el menor contenido de catequina comparado con los otros tratamientos aplicados, ya que entre las temperaturas de 25 y 55°C se encuentra la máxima activación de la polifenoloxigenasa, de acuerdo con los estudios de inactivación por encima de 55°C (13). Con un tratamiento a 45°C la inactivación no se logra, lo que genera totales de fenoles y catequina. Por encima de 55°C la inactivación se logra, pero también se produce un daño en sus características nutricionales y organolépticas.

Cuadro 1. Diseño de mediciones repetidas para el contenido de catequinas (valor medio) en el vino blanco.

Table 1. Repeated measures for catechin control design (mean value) in white wine.

Tratamiento		Tiempo de almacenamiento (meses)	
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	0	3
		Contenido de catequinas* $\pm \delta$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
2	45	0,77 $\pm$ 0,06	1,49 $\pm$ 0,07
	55	0,90 $\pm$ 0,01	1,34 $\pm$ 0,02
	65	0,73 $\pm$ 0,04	1,45 $\pm$ 0,12
	75	0,74 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,08
5	45	0,83 $\pm$ 0,05	1,31 $\pm$ 0,02
	55	0,83 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,12
	65	0,84 $\pm$ 0,11	1,45 $\pm$ 0,04
	75	0,83 $\pm$ 0,07	1,41 $\pm$ 0,12
Vino Control (sin tratamiento)		0,72 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,16

*Valor promedio de los duplicados para dos réplicas

mente, que al ser comparado con el contenido de catequinas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) presente en los vinos estudiados, el máximo valor obtenido a los 3 meses de almacenamiento fue de $1,49\pm 0,07$, para el tratamiento de 45°C durante 2 minutos; lo que indica que los vinos producidos poseen una menor capacidad de oscurecimiento por presentar menor contenido de catequinas que pueden ser degradadas de manera no enzimática. Los vinos blancos jóvenes tienen menores concentraciones de catequinas que los vinos blancos añejados. El incremento del contenido de derivados monoméricos y diméricos del compuesto flavan-3-ol (catequinas) pueden ser razonablemente atribuidos a la ausencia de contacto del vino con el oxígeno atmosférico, lo que permite la hidrólisis de derivados oligoméricos, estos compuestos son oxidados en una moderada extensión durante este período anaeróbico (7). El contenido de catequinas tiende a incrementar en la medida que el vino se añeja. El mosto tratado por 2 minutos a 55°C y almacenado durante tres meses a pesar de que no presentó el más bajo contenido de catequinas ($1,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), al ser comparado con los otros tratamientos aplicados, es el más recomendable, ya que entre las temperaturas de 25 y 55°C es la máxima activación de la enzima polifenoloxidasas, estando esto de acuerdo a los estudios de inactivación térmica de la enzima por encima de 55°C (13), por lo tanto con un tratamiento de 45°C no se logra la inactivación de la enzima lo que genera oxidación de fenoles totales y catequinas, por encima de 55°C se logra la inactivación pero también se

causing sugar caramelize as reported by Coultate, 1998. Wine treated at a temperature higher of 55°C is not recommendable, being the most adequate wine treated at 55°C during 2 minutes, because darkening reactions as a product of anthocyanine absence in white wines being compared with red wine are controlled. These wines lost its ability to keeping color and show a great instability as a result of oxidative process. Additionally, one of big troubles is that contains monomer and oligomer of flavan-3-ol, having an important role in oxidation reactions (7). High catechin content presents in white wines influences on susceptibility of white wines to darkening. Catechin content increases by hydrolysis reaction.

It is observed that for chemical treatments 45°C , 55°C , 65°C and 75°C during time of 2 min, there are not any difference on catechin content for zero and three months of storage, separately. The same happened for every temperature during time of 5 min.

Catechin content for time of 2 min and applied temperatures of 45°C ($1.49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 65°C ($1.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was over the result obtained in control wine ($1.41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) whereas for temperatures of 55°C and 75°C , catechin contents ($1.34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and ($1.38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) respectively, were lower than catechin content presents on control wine. This result shows that must treatment at 55°C during 2 min is the most recommended because it has low catechin content.

A highly significative effect was observed in storage time over catechin content for a significance level of 1%

deteriora nutricional y organoléptica-mente por ocasionar caramelización de azúcares tal como fue reportado por Coultate (3). Por lo tanto recomendar el vino tratado a una temperatura por encima de 55°C no es aconsejable, siendo el más adecuado el vino tratado a 55°C durante 2 minutos ya que se controlan las reacciones de oscurecimiento como producto de que los vinos blancos no contienen antocianinas en comparación con los vinos tintos, por lo tanto ellos pierden la capacidad de mantener el color y exhiben considerablemente gran inestabilidad como resultado de los procesos de oxidación, adicionalmente, uno de los mayores problemas es que contienen monómeros y oligómeros de flavan-3-ol, los cuales tienen un importante rol en las reacciones de oxidación (7). El alto contenido de catequinas presentes en vinos blancos tiene una fuerte influencia sobre la susceptibilidad de los vinos blancos al oscurecimiento. El contenido de catequinas incrementa por la reacción de hidrólisis.

Se observa además que para los tratamientos térmicos, 45°C, 55°C, 65°C y 75°C, durante el tiempo de 2 minutos, no existió una marcada diferencia sobre el contenido de catequinas para cero y tres meses de almacenamiento por separado, de igual forma sucedió para todas las temperaturas durante el tiempo de 5 minutos.

El contenido de catequinas para el tiempo de 2 minutos y las temperaturas aplicadas de 45°C (1,49 mg·L⁻¹) y 65°C (1,45 mg·L⁻¹) estuvo por encima del obtenido en el vino control (1,41 mg·L⁻¹), mientras que para las

(table 2), likewise a highly significative interaction between storage time and temperature; catechin content in wines varies with applied temperatures during thermic treatments and with storage time also. It was not significative effect for a significance level of 1% in thermic treatment duration (2 and 5 min) on catechin content.

In table 3, for inter subjects contrast test, there was not significative effect at 1% of temperatures (45°C, 55°C, 65°C and 75°C) on catechin content for wines of 0 and 3 storage months separately.

There was not significative effect of time (2 and 5 min) for a level of 1% on catechin content, for wines of 0 and 3 storage months separately.

Table 4 shows the repeated measurements experiment design for total phenols content in whites wines treated at temperatures of 45°C, 55°C, 65°C and 75°C during 2 and 5 min for 0 and 3 storage months,

A trend to decrease of total phenols content in wines of 0 to 3 storage months was noted. Temperature with lower phenols content was of 65°C, for 2 and 5 min of treatment duration.

When temperature increases, the content reduction of total phenols between wine without storage and at 3 storage months is lower, as a product of a maximum activation of polyphenoloxydase enzyme between 25 and 55°C, as reported by Valero *et al.*, 1998. Likewise, for treatment carried out at 45°C during 2 and 5 min, there is a maximum activity of polyphenoloxydase enzyme, by

temperaturas de 55°C y 75°C los contenidos de catequinas ($1,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ($1,38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), respectivamente, fueron menores que el contenido de catequinas presentes en el vino control, esto indica que el tratamiento del mosto a 55°C durante 2 minutos es el más recomendado por presentar bajo contenido de catequinas.

De acuerdo con el análisis estadístico mostrado en el cuadro 2 (prueba de contrastes intrasujetos), se observó un efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de catequinas para un nivel de significancia del 1%, así como también una interacción altamente significativa entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura, por lo tanto el contenido de catequinas en los vinos varió con las temperaturas aplicadas durante los tratamientos térmicos y con el tiempo de almacenamiento. No se observó efecto significativo para un nivel de significancia del 1% en la duración del tratamiento térmico (2 y 5 minutos) sobre el contenido de catequinas.

Tal y como se presenta en el cuadro 3, para la prueba de contrastes intersujetos no se observó efecto significativo para un nivel de significancia del 1% de las temperaturas (45°C, 55°C, 65°C y 75°C) sobre el contenido de catequinas, para los vinos a 0 y 3 meses de almacenamiento por separado.

No se observó efecto significativo del tiempo de 2 y 5 minutos para un nivel de significancia del 1% sobre el contenido de catequinas, para los vinos de 0 y 3 meses de almacenamiento por separado.

keeping active and cause a total phenols degradation at the same time of passing time, whereas to 55°C during 2 and 5 min, the enzyme activity begin to decline, as reported by (13).

For the control wine (without treatment) it was observed the maximum decreasing of total phenols between times without storage and 3 storage months, as a consequence of phenoloxydase activity. Hydrolysis reactions have been questioned by several authors for trimer of C1 and T2 and gallic acid dimer, according to this potential hydrolysis, these compounds have been oxydates to a moderate extension during anaerobic periods because wine always keeps on storage, so the catechin content increases (7).

Total phenols medium content for every thermic treatments applied to 0 month of storage is lower than control wine. The total inhibition of polyphenoloxydase enzyme must be reached at 75°C during 15 min if is compared with studies made by (13). Phenols content in treated wines decreased with increasing temperature, by resulting treated wine at 75°C during 2 min with a lower content of total phenols ($190,58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gallic acid), however, use of elevated temperatures can cause sugar caramelize (3).

Treatment time do not affected phenols content. Thermic treatment more recommend is 55°C during 2 min with a low phenols content ($201,20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gallic acid) by comparing to other treatments applied for wine without storage; wine will be lower

Cuadro 2. Análisis de varianza de parcelas divididas lineales de mediciones repetidas del contenido de catequinas para los diversos tratamientos térmicos (Prueba de contrastes intrasujetos).

Table 2. Analysis of variance of lineal split plots from repeated measures in catechin content for different termichal thermics (Intra subjects contrast test).

Fuente	CATEQ	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
CATEQ	Lineal	5,540	1	5,540	958,688	0,000
CATEQ * Tiempo	Lineal	2,681E-02	1	2,681E-02	4,640	0,040
CATEQ * Temperatura	Lineal	6,907E-02	3	2,302E-02	3,984	0,18
Error (CATEQ)	Lineal	0,156	27	5,779E-03		

Nivel de significancia 1%

Cuadro 3. Prueba de contrastes intersujetos para catequinas.**Table 3. Intra subjects contrast test for catechin.**

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intercepto	77,814	1	77,814	10471,328	0,000
Tiempo	3,516E-04	1	3,516E-04	0,047	0,829
Temperatura	7,005E-03	3	2,335E-03	0,314	0,815
Error	0,201	27	7,431E-03		

Nivel de significancia 1%

El cuadro 4, muestra el diseño de experimento de mediciones repetidas para el contenido de fenoles totales en los vinos blancos tratados a las temperaturas de 45°C, 55°C, 65°C y 75°C durante 2 y 5 minutos para 0 y 3 meses de almacenamiento.

Se observó una clara tendencia de disminución del contenido de fenoles totales en los vinos de cero a tres meses de almacenamiento. La temperatura que produjo menor contenido de fenoles fue 65°C, tanto para 2 como para 5 minutos de duración de tratamiento.

A medida que incrementa la temperatura, la reducción del contenido de fenoles totales entre el vino sin almacenamiento y a tres meses de almacenamiento es menor, producto de una máxima activación de la enzima polifenoloxidasas entre 25 y 55°C tal como fue reportado por Valero *et al.* (13), así mismo, para el tratamiento realizado a 45°C durante 2 y 5 minutos existe máxima actividad de la enzima polifenoloxidasas, la cual continúa activa y degrada los fenoles totales a medida que transcurre el tiempo, mientras

darkening susceptibility on time because there are lower total phenols quantities for oxidation and other compound be formed (12). Besides, the wine exposition time to treatment generates a big energy expense.

Total phenols content for thermic treatment applied at 3 storage months, at 45°C during 2 min (168,83 mg•L⁻¹ gallic acid) and 5 min (167,58 mg•L⁻¹ gallic acid), likewise, for 55°C during 2 min (167,58 mg•L⁻¹ gallic acid) and 5 min (178,80 mg•L⁻¹ gallic acid) were over total phenols content showed for control wine (166,2 mg•L⁻¹ gallic acid) being the same diminishing effect of PPO enzyme, as a consequence of its inhibition of wines without storage.

Phenols content for treatment of 65°C during 2 min (149,63 mg•L⁻¹ gallic acid) and 5 min (155,18 mg•L⁻¹ gallic acid) was lower than for treatment of 75°C during 2 min (159,58 mg•L⁻¹ gallic acid) and 5 min (162,78 mg•L⁻¹ gallic acid).

Total phenols content for treatment of 55°C during 2 min for 3 storage months (167.58 mg•L⁻¹ gallic

Cuadro 4. Diseño de mediciones repetidas para el contenido de fenoles (valor medio) en el vino blanco.

Table 4. Repeated measurements design for phenols content (mean value) in white wine.

Tratamiento		Tiempo de almacenamiento (meses)	
		0	3
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Contenido de catequinas* $\pm \delta$ (mg·L ⁻¹)	
2	45	210,75 $\pm$ 1,36	168,83 $\pm$ 7,85
	55	201,20 $\pm$ 6,17	167,58 $\pm$ 3,81
	65	202,23 $\pm$ 4,61	149,63 $\pm$ 7,34
	75	190,58 $\pm$ 2,05	159,58 $\pm$ 7,15
5	45	211,03 $\pm$ 0,41	167,03 $\pm$ 7,69
	55	200,50 $\pm$ 4,67	178,80 $\pm$ 5,57
	65	197,35 $\pm$ 4,03	155,18 $\pm$ 10,20
	75	193,25 $\pm$ 2,86	162,78 $\pm$ 6,29
Vino control (sin tratamiento)		212,68 $\pm$ 4,22	166,23 $\pm$ 5,23

*Valor promedio de los duplicados para dos réplicas.

que a 55°C durante 2 y 5 minutos comienza a declinar a actividad de la enzima tal y como lo indica Valero *et al.* (13).

Para el vino control (sin tratamiento), se observó la máxima disminución del contenido de fenoles entre el periodo sin almacenamiento y tres meses de almacenamiento, como consecuencia de la actividad de la polifenoloxidasas. Las reacciones hidrolíticas han sido cuestionadas por diversos autores para trimeros de C1 y T2 y dímeros galolíticos, en concordancia con esta hidrólisis potencial, estos compuestos han sido oxidados hasta una moderada extensión durante periodos anaeróbicos ya que el vino permanece almacenado siempre, razón por la cual incrementa el contenido de catequinas (7).

El contenido medio de fenoles totales para todos los tratamientos

acid) was low by comparing with other applied treatments for wine without storage, which guarantee a lower darkening ability, caused for a no enzymatic darkening and changes on organoleptic properties lower.

A highly significant effect 1% was observed of storage time on phenols (table 5), likewise a highly significant between storage time and temperature interaction, so total phenol content in wines vary with temperatures applied during thermic treatments and with storage period.

There was no significant effect for a level of 1% in thermic treatment duration (2 and 5 min) on total phenols content for 0 and 3 storage months.

Table 6 shows the statistical analysis of each inter subject factor (time and temperature) on total

térmicos aplicados a cero mes de almacenamiento, es menor que en el vino control. La completa inhibición de la enzima polifenoloxidasas se debe alcanzar a 75°C durante 15 minutos si se compara con los estudios realizados por Valero *et al.* (13). El contenido de fenoles en los vinos tratados disminuyó con el incremento de la temperatura, resultando el vino tratado a 75°C durante 2 minutos con menor contenido de fenoles totales (190,58 mg.L⁻¹ ácido gálico), sin embargo, el uso de temperaturas muy elevadas puede ocasionar caramelización de azúcares (3).

El tiempo de duración del tratamiento no afectó el contenido de fenoles. El tratamiento térmico más recomendable resultó ser el de 55°C durante 2 minutos con un bajo contenido de fenoles (201,20 mg.L⁻¹ ácido gálico) comparado con los demás tratamientos aplicados para el vino sin almacenamiento, por lo cual el vino tendrá menor capacidad de oscurecimiento en el tiempo por existir menores cantidades de fenoles totales que se oxiden y formen otros compuestos (12), además el menor tiempo de exposición del vino al tratamiento genera menor gasto de energía.

Los contenidos de fenoles totales para el tratamiento térmico aplicado a tres meses de almacenamiento, a 45°C durante 2 minutos (168,83 mg.L⁻¹ ácido gálico) y 5 minutos (167,03 mg.L⁻¹ ácido gálico), así como, para 55°C durante 2 minutos (167,58 mg.L⁻¹ ácido gálico) y 5 minutos (178,80 mg.L⁻¹ ácido gálico), estuvieron por encima del contenido de fenoles totales arrojado por el vino control (166,2 mg.L⁻¹ ácido gálico),

phenol content at significance level of 1%. There was not a significative effect of temperature on total phenols content, for wines of 0 and 3 storage months.

There was no significative effect of the applied treatment time of 2 and 5 min for a significance level of 1% on the total phenols content, for wines at 0 and 3 storage months.

Conclusions

Storage time and thermic treatments applied to must caused a highly significative effect on catechin content and total phenols, at level of significance of 1%, however, duration time of thermic treatment applied (2 and 5 min) have not significative effect on catechin content for significance level of 1%.

Thermic treatment applied to must at 55°C during 2 min is the more recommend for oxidation control in white wines produced from grapes variety *Malvasia*, by guarantying through this treatment, a catechin and total phenols content lower, by decreasing oxidation for no enzymatic darkening on time.

End of english version

siendo este el mismo efecto de la disminución de la actividad de la enzima PPO, como consecuencia de su inhibición de los vinos sin almacenamiento.

El contenido de fenoles para el tratamiento de 65°C durante 2 minutos (149,63 mg.L⁻¹ ácido gálico) y 5 mi-

nutos (155,18 mg·L⁻¹ ácido gálico), fue menor que para el tratamiento de 75°C durante 2 minutos (159,58 mg·L⁻¹ ácido gálico) y 5 minutos (162,78 mg·L⁻¹ ácido gálico).

El contenido de fenoles totales para el tratamiento de 55°C durante 2 minutos para tres meses de almacenamiento (167,58 mg·L⁻¹ ácido gálico) fue bajo comparado con los demás tratamientos aplicados para el vino sin almacenamiento, hecho que garantiza menor capacidad de oscurecimiento, debido a la menor posibilidad de oscurecimiento no enzimático y menores cambios en la propiedades organolépticas del producto.

De acuerdo con el análisis estadístico mostrado en el cuadro 5 (prueba de contrastes intrasujetos), se observó efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de fenoles totales para un nivel de significancia del 1%, así como también, una interacción altamente significativa entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura, por lo tanto el contenido de fenoles totales en los vinos varía con las temperaturas aplicadas durante los tratamientos térmicos y con el periodo de almacenamiento.

No se observó efecto significativo para un nivel de significancia del 1% en la duración del tratamiento térmico (2 y 5 minutos) sobre el contenido de fenoles totales para cero y tres meses de almacenamiento.

El cuadro 6, muestra el análisis estadístico del efecto de cada factor

intersujeto (tiempo y temperatura) sobre el contenido de fenoles totales a un nivel de significancia del 1%. No se observó un efecto altamente significativo de la temperatura sobre el contenido de fenoles totales, para los vinos a 0 y a 3 meses de almacenamiento.

No se observó efecto significativo del tiempo de tratamiento aplicado de 2 y 5 minutos para un nivel de significancia del 1% sobre el contenido de fenoles totales, para los vinos a 0 y a 3 meses de almacenamiento.

Conclusiones

El tiempo de almacenamiento y los tratamientos térmicos aplicados a los mostos causaron un efecto altamente significativo sobre el contenido de catequinas y fenoles totales, a un nivel de significancia del 1%, sin embargo, el tiempo de duración del tratamiento térmico aplicado (2 y 5 minutos) no tuvo efecto significativo sobre el contenido de catequinas para un nivel de significancia del 1%.

El tratamiento térmico aplicado al mosto a 55°C durante 2 minutos es el más recomendable para el control de la oxidación en vinos blancos producidos a partir de la variedad de uva *malvasía*, garantizándose a través de este tratamiento bajo contenido de catequinas y fenoles totales, disminuyéndose la oxidación producto de oscurecimiento no enzimático con el tiempo.

Cuadro 5. Análisis de varianza de parcelas divididas con contrastes lineales de mediciones repetidas del contenido de fenoles totales para los diversos tratamientos térmicos. Prueba de contrastes intrasujetos.

Table 5. Analysis of Variance of split plots with lineal contrast of total phenol content measurements for thermic treatments. Intra subject contrast test.

Fuente	POLIF	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
POLIF	Lineal	22126,562	1	22126,562	657,273	0,000
POLIF * Tiempo	Lineal	108,160	1	108,160	3,213	0,084
POLIF * Temperatura	Lineal	1078,875	3	359,625	10,683	0,000
Error (POLIF)	Lineal	908,932	27	33,664		

Nivel de significancia 1%

Cuadro 6. Prueba de contrastes intersujeto para el contenido de fenoles totales.

Table 6. Inter subject contrast test for phenols content.

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intercepto	2126128,516	1	2126128,5	63231,502	0,000
Tiempo	60,451	1	60,451	1,798	0,191
Temperatura	2310,602	3	770,201	22,906	0,815
Error	907,862	27	33,625		

Nivel de significancia 1%

Literatura citada

1. Amerine, M.A. y C.S. Ough. 1976. *Análisis de Vinos y Mostos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 159 págs.
2. Cacho, J.F. 1997. Oxidación del Vino. Factores que condicionan la vida de los vinos blancos jóvenes. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 16 (10) 81-93.
3. Coultate, T.P. 1998. *Manual de química y bioquímica de los alimentos*. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 365 págs.
4. Fabios, M., A. López-Toledano, M. Mayen, J. Merida y M. Medina. 2.000. Phenolic Compounds and Browning in Sherry Wines Subjected to Oxidative d Biological Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2.155-2.159.
5. Jong, SC. y M.I. Edward. 1.990. *Catalogue of Yeasts*. Eighteenth edition. Rockville Maryland. 230 págs.
6. Kuehl, R. 2001. *Diseño de experimentos*. Segunda edición. Editorial Thompson.
7. Mayén, M., R. Barón, J. Mérida y M. Medina. 1997. Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wine from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry*. 58, 89-95.
8. Peynaud, E. 1977. *Enología Práctica. Conocimiento y Elaboración de Vino*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. 414 págs.
9. Razmkhab, S., A. López-Toledano, J. Ortega, M. Mayen, J. Merida y M. Medina. 2.002. Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7.432-7.437.
10. Spagna, G., R. Barbagallo and G. Pifferi. 2000. Fining Treatments of White Wines by Means of Polymeric Adjuvants for Their Stabilization against Browning. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4619-4627.
11. Urribarri, M. y N. Soto. 2003. *Trabajo Especial de Grado*. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Efecto de la Concentración de la Lactosa sobre el Crecimiento de la *Kluyveromyces marxianus* y la Producción de Etanol en Lactosuero. 71 págs.
12. Vaimakis V. y I. Roussis. 1997. Effect of Grape Blanching on the Oxidation of White Wine.

- Viticulture Enology and Science. 52, 113-114.
13. Valero, E., R. Varón y F. García 1988. Characterization of Polyphenol Oxidase from Airen Grapes. Journal of Food Science. 53, 1482-1485.
14. Yilmaz, H., T. Taskin y B. Otludil 2003. Polyphenol Oxidase Activity during Rooting in Cuttings of Grape (*Vitis vinifera* L.) Varieties. Turk J Bot, 27, 495-498