

Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas

DENOYA, G. I.¹; ARDANAZ, M.²; SANCHO, A. M.¹; BENÍTEZ, C. E.¹; GONZÁLEZ, C.^{1,3}; GUIDI, S.¹

RESUMEN

El pardeamiento enzimático, catalizado principalmente por la Enzima Polifenol Oxidasa (PPO), es uno de los principales problemas que afectan la calidad y limitan la vida útil de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Los compuestos tradicionalmente utilizados para inhibir la PPO, son los sulfitos. Sin embargo, se ha desalentado su utilización en la industria alimentaria debido a que se han registrado casos de reacciones alérgicas, especialmente en individuos asmáticos. Como consecuencia, en la actualidad, se evalúa la utilización de otros compuestos como potenciales inhibidores de la enzima, para garantizar productos frescos y naturales. En el presente trabajo, se analizó la evolución de la actividad de la enzima PPO y las características cromáticas de la pulpa de rodajas de manzanas cv. Granny Smith, tratadas por inmersión en una solución de aditivos. Los tratamientos utilizados fueron: I. 2% ácido ascórbico + 1% ácido cítrico + 0,5% EDTA, II. 1% ácido ascórbico + 0,5% ácido cítrico + 0,25% EDTA y III. agua, empleada como control. Durante el almacenamiento, se evaluaron las coordenadas de color del espacio CIE L*a*b* de las rodajas y se demostró que los tratamientos I y II fueron efectivos en evitar el pardeamiento de la fruta. La evaluación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la PPO, en extractos de manzanas sometidas a los distintos tratamientos, mostró que el más severo (I) fue el que produjo el mayor grado de inhibición de la enzima, en todos los tiempos analizados. Se propone evaluar a futuro, la efectividad de estos inhibidores "in vitro", a efectos de compararlos con los resultados obtenidos en rodajas de manzana.

Palabras clave: polifenol oxidasa, ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA, procesamiento mínimo, manzanas.

ABSTRACT

Enzymatic browning, which is mainly catalyzed by the enzyme polyphenol oxidase (PPO), is one of the major problems affecting quality and limiting shelf life of fresh cut fruits and vegetables. Traditionally, sulfites are used to inhibit the enzyme. However, its presence in the food has induced allergic reactions, particularly in asthmatic persons. Consequently, it has been evaluated the effect of other PPO inhibitors in order to obtain fresh and natural products. In the present work, the evolution of PPO activity and the chromatic characteristics of the

¹ Instituto Tecnología de Alimentos- CIA, INTA-CC.77, B1708WAB-Morón, Bs. As, Argentina. Tel: +541146210446.

Correo electrónico: gdenoya@cnia.inta.gov.ar

²Pasante de la Universidad de Morón, Cabildo 134 (B1708JPD) Morón, Prov. de Buenos Aires.

CONICET - Av. Rivadavia 1917 (C1033AAJ), CABA, Argentina

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Conicet

pulp were evaluated in cv. Granny Smith apple slices. The slices were submitted to three treatments: I. 2% ascorbic acid + 1% citric acid + 0.5% EDTA; II. 1% ascorbic acid + 0.5% citric acid + 0.25% EDTA; and III. water, used as control. During the storage, parameters of the CIE L*a*b* color space of the slices were evaluated, indicating that both treatments containing additives were effective in preventing browning. The specific activity of PPO was determined spectrophotometrically in apple extracts obtained from each treatment. The results indicated that the stronger treatment (I) had induced the most effective inhibition of the enzyme. On view of the present results, It is proposed to evaluate the "in vitro" effectiveness of the inhibitors in order to compare these results with the ones obtained with apple slices.

Keywords: poliphenol oxidase, fresh cut fruit, ascorbic acid, citric acid, EDTA, apples.

INTRODUCCIÓN

Últimamente, la producción de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (FyHMP) ha crecido notoriamente tanto en cantidad como en variedad (Watada, 1996), debido a que proporcionan al consumidor un producto similar al fresco con una vida útil relativamente prolongada y, al mismo tiempo, garantizan su inocuidad, calidad nutritiva y sensorial (Wiley, 1997).

La apariencia, determinada principalmente por el color, es uno de los atributos más utilizados por los consumidores para evaluar la calidad de FyHMP. El color, se debe a los pigmentos naturales, como las clorofilas, los carotenoides y las antocianinas, o a los pigmentos que resultan de las reacciones de pardeamiento enzimático. Este proceso, relacionado con la actividad de la enzima PPO, no ocurre en células de la planta intacta debido a que los sustratos (compuestos fenólicos) están contenidos en vacuolas celulares citoplasmáticas, separadas de la enzima. Una vez que el tejido celular es dañado, ya sea por la propia manipulación o por el corte de la fruta, se pierde la compartimentalización, se pone en contacto la enzima y el sustrato, y se desencadenan las reacciones de pardeamiento (Toivonen & Brummell, 2008).

La Comisión de Enzimas (EC-Enzyme Commission) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), clasifica a la PPO como EC 1.10.3.1., perteneciente a las oxidoreductasa que actúan sobre los difenoles con el oxígeno como aceptor (Nevin, 2009). Esta enzima, actúa sobre dos tipos de sustratos, los monohidroxifenoles (ejemplo p-cresol), hidroxilándolos en posición orto con respecto al grupo hidroxilo original (EC 1.14.18.1), y sobre los o-dihidroxifenoles (ejemplo catecol) oxidándolos a benzoquinona por remoción del hidrógeno del grupo hidroxilo (EC 1.10.3.1) (Ramírez and Whitaker, 2003; Ayaz *et al.*, 2007). A su vez, se produce la formación no enzimática de melaninas (compuestos poliméricos que dan coloraciones marrones, rojas y/o negras).

La característica estructural más importante de la PPO es la presencia, en su centro activo, de dos átomos de cobre unidos a histidina. Alrededor de ellos, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos con anillos aromáticos, importantes

para su unión a los sustratos (Calvo, 2007). La primer metodología utilizada para controlar el pardeamiento enzimático, consistió en la adición de sulfitos (Sapers, 1993) que actúan como agentes reductores transformando las o-quinonas en difenoles menos reactivos para prevenir el desarrollo de melaninas. Si bien de esta forma se previene el pardeamiento enzimático, recientemente, su utilización ha sido restringida en vegetales y frutas por la Administración de Fármacos y Alimentos de EEUU (Langdon, 1987). En nuestro país, la Resolución Conjunta 57/2010 y Modificación 548/2010 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), desalienta el uso de esta sustancia porque hubo casos de reacciones alérgicas en individuos, especialmente asmáticos, que consumieron alimentos que contenían este agente reductor (Pizzocaro *et al.*, 1993).

Las reacciones de pardeamiento enzimático pueden, también controlarse mediante métodos físicos que incluyen la reducción de temperatura y/o de la disponibilidad del oxígeno molecular, el uso de atmósferas modificadas o recubrimientos comestibles y tratamientos con irradiación gamma o altas presiones hidrostáticas. Por otro lado, puede utilizarse métodos químicos basados en la utilización de compuestos que inhiben la enzima, reducen la disponibilidad del sustrato y/o de los productos de la catálisis enzimática que evitan la formación de productos coloreados. Su aplicación en los alimentos está restringida debido a consideraciones relevantes tales como la toxicidad, la salubridad y el efecto que puede causar sobre el sabor, la textura o eventualmente por el costo.

Entre los agentes reductores utilizados en la actualidad, se encuentra el ácido ascórbico que reduce las o-benzoquinonas a o-difenoles (Whitaker and Lee, 1995). Dado que durante la reacción este compuesto se consume por oxidación, la protección que confiere es sólo temporal y también pueden aplicarse los ácidos orgánicos para controlar el pardeamiento enzimático que logran disminuir el pH y garantizar la inocuidad microbiológica. Además, algunos de ellos, pueden actuar como fungicidas/fungistáticos y como inhibidores del crecimiento de gran parte de la flora de deterioro.

Los acidulantes se utilizan frecuentemente en combinación con otros agentes de antipardeamiento, debido a que es muy

difícil lograr una inhibición completa del oscurecimiento únicamente por el control del pH. El más utilizado es el ácido cítrico que reduce el pardeamiento capturando o quelando el cobre del sitio activo de la PPO, y potencia el efecto de compuestos tales como el ácido ascórbico (Wiley, 1997).

Otro compuesto de interés es el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) que inactiva a la enzima y forma complejos con iones de metales pesados tales como el cobre de la PPO.

En concordancia con lo expresado, el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad de la PPO, las características cromáticas y su evolución durante el almacenamiento refrigerado (1,5 °C) por 16 días, en rodajas de manzanas cv. Granny Smith, tratadas por inmersión con una combinación de aditivos (ácido cítrico, ácido ascórbico y EDTA) en diferentes proporciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron manzanas cv. Granny Smith, categoría elegido, adquiridas en el Mercado Central de Buenos Aires, Argentina y procedentes del Alto Valle del Río Negro cuyo peso medio por fruto fue de 180 gramos.

Procesamiento

Las frutas fueron prelavadas por inmersión durante dos minutos en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm) fueron peladas, descorazonadas y cortadas en rodajas. Posteriormente, los lotes de la fruta fueron sometidos durante cinco minutos a un baño de inmersión con distintos aditivos.

Los tratamientos aplicados fueron: I. 2% ácido ascórbico + 1% ácido cítrico + 0,5% EDTA; II. 1% ácido ascórbico + 0,5% ácido cítrico + 0,25% EDTA y III agua, utilizada como control, para lo cual, en cada tratamiento, se realizaron tres réplicas.

Posteriormente, las rodajas fueron escurridas, acondicionadas en bandejas de polietileno (10 rodajas con aproximadamente 200 g por bandeja) y cubiertas por un film de grado alimenticio (70% de resina de policloruro de vinilo (PVC), de espesor 9 µm, permeabilidad al O₂ de 1536 cm³/m².24 h.1 atm y al CO₂ de 3690 cm³/m².24 h.1 atm medidas a 0% HR y 23°C y la permeabilidad al vapor de H₂O 99 g/m².24 h medida a 50% HR y 23°C). Las rodajas se ubicaron apiladas en cinco pares por bandeja y posteriormente fueron almacenadas durante 16 días en cámara climatizada a 1,5 °C, cuyo contenido en sólidos solubles en las rodajas al inicio del tratamiento fue de 9,9 °Brix, con acidez málica de 7,6 g/l, y el pH de 3,32.

Diseño experimental

Los datos obtenidos en el estudio de las características cromáticas y en la determinación de la actividad de la PPO,

se analizaron mediante un diseño factorial balanceado de dos factores: tratamiento (I, II y III) y tiempo (1, 7 y 16 días) en donde cada bandeja contuvo rodajas de manzanas como una unidad experimental.

El análisis aplicado se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS® versión 12 (SPSS Inc., Illinois). En el caso de los datos correspondientes a la determinación de actividad de la PPO, se aplicó la transformación de Taylor para homogeneizar los datos.

Determinaciones analíticas

Todas las evaluaciones fueron realizadas a los 0, 7, y 16 días de almacenamiento en refrigeración.

Características cromáticas

Las características cromáticas del espacio CIE L*a*b* fueron evaluadas con un colorímetro Konica Minolta modelo CR-400, iluminante D₆₅. Las determinaciones se efectuaron sobre la cara expuesta de las cinco rodajas de manzana superiores de cada bandeja tomando cuatro valores en cruz (total: 20 determinaciones por muestra y por fecha).

Actividad de la PPO

La extracción de la enzima para la determinación de su actividad, se hizo según el método de Yemenicioğlu *et al.* (1997). Para ello, se pesaron 200 g de rodajas de manzana, se cortaron en pequeños trozos y se les adicionó 250 ml de acetona fría (-20 °C). El preparado fue homogeneizado en una procesadora Waring Blender durante 2 minutos a máxima velocidad. El homogenato fue filtrado a través de un embudo Buchner, utilizando papel Whatman N.º1, y el residuo obtenido fue extraído nuevamente con 200 ml de acetona fría y filtrado en las mismas condiciones. Este procedimiento, fue repetido tres veces más, obteniéndose finalmente un polvo de acetona que se secó en estufa de vacío durante cuatro horas a temperatura ambiente, y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Para la extracción de la PPO, se tomaron 2 g de polvo de acetona y se suspendieron en 120 ml de buffer fosfato de potasio 0,05 M y pH 6,8. La suspensión fue homogeneizada por agitación durante 30 minutos a 4 °C. Luego, el extracto fue clarificado por filtración con gasas y, posteriormente, la solución fue centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, fue utilizado como fuente de enzima para todas las mediciones realizadas. La actividad de la PPO fue evaluada a 420 nm con el uso de un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer, modelo Lambda Bio 20. Los valores obtenidos fueron registrados en varios intervalos de tiempo, durante tres minutos y el resultado de cada medición enzimática correspondió al promedio de tres mediciones. Las condiciones del ensayo para la determinación de la actividad de la PPO, fueron: 0,4 ml del extracto enzimático, 0,1 ml de catecol (17 mM), buffer acetato de sodio 0,05 M pH 5,2 csp un volumen final de 2,5 ml. Todas

las determinaciones se llevaron a cabo a 30 °C, por triplicado. Se definió la actividad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que cataliza el aumento de 0,1 unidades de absorbancia (UA), por minuto a 420 nm y a 30 °C (Flurkey and Jen, 1978). La actividad enzimática, fue calculada de la porción lineal de la curva y la concentración de proteína del extracto enzimático fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando BSA (0,2 mg/l) como patrón. La actividad específica (AE), se definió como la actividad enzimática por unidad de proteína (UE/mg proteína).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características cromáticas

En la tabla 1, se observan los resultados promedio obtenidos para el parámetro L* (luminosidad) en rodajas de manzanas cv. Granny Smith sometidas a los distintos tratamientos durante el almacenamiento refrigerado. El análisis estadístico indicó que la interacción tratamiento-tiempo no fue significativa ($p > 0,05$). Por lo tanto, la comparación entre las medias de los factores Tratamiento y Tiempo de conservación se realizó en forma independiente.

Tratamientos	Almacenamiento (días)		
	1	7	16
2 % AA + 1% AC + 0,5% EDTA	93,16 Aa	87,28 Ab	88,0 Ab
1 % AA+0,5 %AC+ 0,25%EDTA	92,41 Aa	87,53 Ab	88,3 Ab
Agua (control)	90,64 Ba	84,46 Bb	84,8 Bb

Tabla 1. Medias obtenidas para el parámetro L* (luminosidad) en rodajas de manzanas cv. Granny Smith sometidas a distintos tratamientos durante el almacenamiento refrigerado

Ref. AA (ácido ascórbico), AC (ácido cítrico).

Las letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas al efecto Tratamiento y efecto de Tiempo, respectivamente (Tukey, $p < 0,05$).

Los tratamientos I y II, no fueron significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$) y ambos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del control para todos los tiempos analizados. Las rodajas de manzanas sometidas a los tratamientos I y II (combinación de aditivos), mostraron una mayor luminosidad respecto de las muestras utilizadas como control (inmersión en agua). Una disminución en el valor de luminosidad (L*) se asocia a un aumento del pardeamiento enzimático (Rocha and Morais, 2003). En las muestras sometidas a los tratamientos que utilizan combinaciones de aditivos, el valor de L* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en la muestra control, inmediatamente después de tratadas, lo que indicó una coloración más clara.

En lo que respecta a la evolución de este parámetro durante el almacenamiento refrigerado, se observó que al primer día (tiempo=0), los valores de L* de todas las muestras fueron los mayores ($p < 0,05$). A partir del día 7, los valores de L* disminuyeron significativamente ($p < 0,05$), sugiriendo que las muestras fueron tomando una coloración más oscura. Estos valores se mantuvieron sin cambios ($p > 0,05$) hasta el final del período analizado.

Tratamientos	Almacenamiento (días)		
	1	7	16
2 % AA + 1% AC + 0,5% EDTA	-5,08 ab	-4,65 b	-4,79 b
1 % AA+0,5 %AC+ 0,25%EDTA	-5,42 a	-4,90 ab	-5,03 ab
Agua (control)	-3,48 c	-2,61 d	-2,39 d

Tabla 2. Medias obtenidas para el parámetro a* en rodajas de manzanas cv. Granny Smith sometidas a distintos tratamientos durante el almacenamiento refrigerado

Ref. AA (ácido ascórbico), AC (ácido cítrico).

Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en el efecto interacción Tratamiento-Tiempo (Tukey, $p < 0,05$).

La tabla 2, muestra los resultados promedio obtenidos para el parámetro a*(componente verde-rojo) donde las muestras sometidas a los tratamientos I y II tuvieron valores de a* significativamente menores ($p < 0,05$) que aquellas muestras sometidas al tratamiento control en todo el período estudiado. No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos con aditivos para lo cual funcionó como indicativo del cambio de cromaticidad del verde (valores negativos) al rojo (valores positivos) que está correlacionado en forma positiva con los cambios de color de las manzanas frescas (Goupy *et al.*, 1995). El pardeamiento enzimático también se evidencia por un aumento del parámetro a*, al indicar una mayor tendencia hacia el color rojo (Rocha and Morais, 2003) que fue observada sólo en las muestras control (III). Durante el período estudiado, las manzanas tratadas en agua mostraron cambios hacia valores menos negativos (de -3,48 a -2,39). Mientras que, las muestras sometidas a los tratamientos I y II, no mostraron cambios significativos en a* durante la conservación frigorífica.

Determinación de la Actividad de la PPO

Tratamientos	Almacenamiento (días)		
	1	7	16
2 % AA + 1% AC + 0,5% EDTA	0,16 Bb	0,71 Ba	1,25 Ba
1 % AA+0,5 %AC+ 0,25%EDTA	5,10 Ab	6,41 Aa	7,78 Aa
Agua (control)	6,02 Ab	7,37 Aa	7,87 Aa

Tabla 3. Medias obtenidas para la Actividad específica de la PPO (UE/mg proteína) para cada combinación Tratamientos y Tiempo de almacenamiento

Ref. AA (ácido ascórbico), AC (ácido cítrico).

Las letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas al efecto Tratamiento y efecto de Tiempo, respectivamente (Tukey, $p < 0,05$).

La tabla 3, muestra los resultados promedio obtenidos en la determinación de la actividad específica (AE) de la PPO en cada uno de los tratamientos aplicados donde la interacción tratamiento-tiempo no fue significativa ($p > 0,05$). Sin embargo, la comparación entre las medias de los factores tratamiento y tiempo de conservación se realizó en forma independiente. Al comparar los resultados de los tratamientos entre sí, se observó que la actividad de la enzima en tratamiento I fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la correspondiente a los tratamientos II y III en todos los tiempos.

pos evaluados (0, 7 y 16 días) y que sugirió un mayor grado de inhibición de la enzima.

Al cabo de 16 días, la comparación de los tres tratamientos demostró que las concentraciones de aditivos en el tratamiento II, no fueron suficientes para inhibir la enzima en la totalidad de la fruta, en consecuencia, la AE de la enzima aumentó, de forma similar a la AE obtenida en la fruta control.

CONCLUSIONES

Al comparar la AE de la enzima con el análisis instrumental del color en las rodajas de manzanas, para los distintos tratamientos y tiempos de conservación, se advirtió que existe una cierta disparidad en los resultados obtenidos. En el análisis instrumental, aquellas rodajas que estuvieron inmersas en los tratamientos I y II no mostraron evidencias de pardeamiento enzimático. Contrariamente, los resultados obtenidos en la medición de la AE de la PPO mostraron que el único tratamiento que resultó efectivo en lograr la inhibición de la enzima fue el tratamiento I.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, inducen a encarar a futuro ensayos para probar la efectividad de los inhibidores directamente sobre extractos que se obtienen de la enzima, a propósito de la determinación de actividad, y que permitiría relacionar estos resultados con los obtenidos en las rodajas de manzana.

Otro aspecto de importancia es realizar a futuro un análisis sensorial del producto mediante panelistas entrenados para evaluar y determinar si existen diferencias en propiedades sensoriales de los frutos, diferentes del color, debido a los tratamientos aplicados. Es importante poder ofrecer en el mercado un producto que se preserve en el tiempo mediante la reducción o supresión del pardeamiento enzimático pero también, es importante, que conserven sus propiedades sensoriales originales, y las características de "fresco" para lograr así una mejor aceptabilidad por parte del consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto INTA - AETA PE 1671. Se agradece la colaboración de los auxiliares del Instituto Tecnológico de Alimentos del CNIA-INTA Castelar.

BIBLIOGRAFÍA

- ANMAT http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_cca.asp (Verificado: febrero 2011)
- AYAZ, F.A.; DEMIR, O.; TORUN, H.; KOLCUOGLU, Y.; COLAK, A. (2007). "Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening". *Food Chem.*, 106, 291-298.
- CALVO, M. (2007). *Bioquímica de los Alimentos*. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html> (Verificado: 12 de septiembre de 2011).
- FLURKEY, W. H.; JEN, J. J. (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.*, 43, 1826-1831.
- GOUPY, P.; AMIOT, M.J.; RICHARD-FORGET, F.; DUPRAT, F.; AUBERT, S.; NICOLAS, J. (1995). "Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic substrates by apple polyphenoloxidase". *J. of Food Sci.* 60: 497- 501.
- LANGDON, T.T. (1987). Prevention of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfating agents. *Food. Technol.* 41, 64-67.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- NEVIN, R. (2009). *Enzyme structures database*. London. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/enzymes/>. (Verificado: 4 de febrero 2012).
- PIZZOCARO, F.; TORREGIANI, D.; GILARDI, G. (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric and sodium chloride. *J. Food Processing Preservation*, 17, 21-30.
- RAMIREZ, E.C.; WHITAKER, J.R. (2003). Polyphenol oxidase: p. 509-523. En: J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen & D.W.S. Wong (eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc. New York.
- ROCHA, A.; MORAIS, A. (2003). Shelf life of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour changes. *Food Control*. 14, 13-20.
- SAPERS, G.M. (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technology* 68, 75-84.
- TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest. Biol. Technol.* 48, 1-14.
- WATADA, A. E.; KO, N. P.; MINOTT, D. A. (1996). Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest. Biol. Technol.* 9, 115-125.
- WHITAKER, J.R.; LEE, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *ACS Sump. Sr.* 600, 2-7.
- WILEY, R. (1997). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Acribia. España
- YEMENICIOĞLU, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. (1997). Heat inactivation of Apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *J. Food Sci.*, 62: 508-510.