



PRINCIPADO DE ASTURIAS

**CONSEJERIA DE MEDIO RURAL
Y PESCA**

**INFORMACIÓN
TÉCNICA**

7 / 90

**ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL PROCESO DE MADURACIÓN EN
VARIEDADES ASTURIANAS DE MANZANO DE SIDRA (Campaña
1987-88): APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DEL MOMENTO
ÓPTIMO DE MADUREZ.**

**AA. VV.
CENTRO DE EXPERIMENTACIÓN AGRARIA
(Unidad de sidras)
VILLAVICIOSA**

ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE VARIEDADES ASTURIANAS DE MANZANO DE SIDRA (CAMPAÑA 1987-88): APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO DE MADUREZ.

Juan MANGAS ALONSO (1)

Domingo BLANCO GOMIS (2)

Enrique DAPENA DE LA FUENTE (1)

M. D. GUTIÉRREZ ÁLVAREZ (2)

Alejandro NOVAL VALLINA (1)

W. José MORAN GUTIÉRREZ (2)

Esteban DÍAZ CAMPILLO (1)

Javier MORENO FERNÁNDEZ (1)

RESUMEN

Se ha estudiado la evolución de los azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios durante la fase final de la maduración de cinco variedades de manzana asturianas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Así mismo, se estudió la evolución del nitrógeno total, polifenoles (índice Folin), azúcares totales y almidón (test del yodo) a lo largo del mismo periodo en las citadas variedades.

Se aprecian algunas diferencias de comportamiento en la evolución de los azúcares mayoritarios (fructosa, sacarosa, glucosa y sorbitol) en las cinco variedades estudiadas, siendo la fructosa el azúcar que fundamentalmente se acumula en el fruto en la fase final de la maduración.

Al final de la maduración se ha observado un incremento en el contenido de los azúcares totales, unido a una fuerte disminución de ácido málico y nivel de almidón, precedidos por un mínimo en el contenido de nitrógeno y polifenoles.

PALABRAS CLAVE

Manzana, maduración, azúcares, ácidos orgánicos, nitrógeno, polifenoles, almidón, HPLC

(1) Centro de Experimentación, Agraria, Apdo. 13, 33300 Villaviciosa (Asturias).

(2) Departamento de Química-Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del proceso de maduración de la manzana se producen una serie de transformaciones bioquímicas que afectan a los contenidos en distintos componentes, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, etc., que condicionan sus características sensoriales y valor nutritivo, alcanzándose un equilibrio óptimo de los mismos en el momento de su madurez.

La función, evolución e importancia de estos compuestos, en particular de azúcares y ácidos orgánicos, ha sido y es motivo de constantes estudios, habiéndose demostrado su incidencia tanto en el proceso de maduración y desarrollo del fruto, como en la síntesis de diversos componentes de éste. A modo de ejemplo, conviene señalar que los azúcares son utilizados en la síntesis de compuestos fenólicos (ácidos cinámicos, flavonoides, chalconas, etc.), los cuales se forman a través de la ruta del shiquimato y el metabolismo general del fenil propanoide (GROSS, 1980; AMRHEIM y col., 1982), habiendo sido también descrita la relación que existe entre el desarrollo del color rojo de la manzana (síntesis de antocianos) y la actividad catabólica de la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato (GIANFAGNA y BERKOWITZ, 1986). Por otro lado, la pared celular vegetal está formada fundamentalmente por carbohidratos complejos que son sintetizados a partir de azúcares más sencillos (LAMPORT, 1970), estando implicada la degradación de estos Polisacáridos en los cambios

fisiológicos e histológicos que se producen en el fruto a lo largo de su maduración.

El sorbitol es el principal producto fotosintetizado en las hojas del manzano (BERUTER y KALBERER, 1983) y la principal forma de carbono transportada hacia el fruto (LOESCHER y col., 1982), donde es el responsable de la formación de los carbohidratos más simples (HANSEN, 1970; YAMAKI e ISHIKAWA, 1986). La sacarosa es la fuente de carbono utilizada para el crecimiento celular de los frutos jóvenes (BERUTER, 1985), mientras que la fructosa es el azúcar que se acumula fundamentalmente en el desarrollo del fruto.

Los ácidos orgánicos están estrechamente relacionados con el proceso de maduración de los frutos climatéricos, en los que se produce etileno a partir del ácido 1 amino 1 carboxil ciclopropano (MANSOUR y col., 1986) y una intensa actividad respiratoria, durante la cual se consume ácido málico a través de su descarboxilación oxidativa (HULME y col., 1963). Así mismo, este ácido puede ser utilizado en la formación de glúcidos por medio de la gluconeogénesis (RIBEREAU-GAYON y PEYNAUD, 1971).

Por otro lado, a nivel tecnológico, cabe destacar el hecho de que estos componentes, ácidos y azúcares, junto con aminoácidos y proteínas, durante el proceso de elaboración de los 'concentrados de manzana y a lo largo de su conservación, están implicados en los procesos de oscurecimiento no enzimático

(Reacción de Maillard). Los ácidos orgánicos parecen tener un papel catalítico en los citados procesos, mientras que los carbohidratos reaccionan con los compuestos nitrogenados formando pigmentos oscuros, pudiendo aumentar la concentración total de azúcares reductores a lo largo del almacenamiento de los concentrados como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa (BABSKY y col., 1986).

Así mismo, el conocimiento de la evolución de los azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios, junto con los polifenoles y nitrógeno total, presenta un gran interés desde el punto de vista de elaboración de la sidra. Los primeros son sustratos fácilmente metabolizables por los microorganismos, estando estrechamente relacionada la calidad de la sidra obtenida con el tipo y concentración existente de azúcares y ácidos orgánicos en el mosto inicial.

Los polifenoles juegan un papel importante tanto en el control del sistema Redox del mosto como en el desarrollo del pardeamiento de éste, afectando además su presencia al crecimiento de los diferentes microorganismos a lo largo del proceso de elaboración de la sidra y a la producción de determinados compuestos volátiles.

El interés en conocer la evolución del nitrógeno a lo largo de la maduración del fruto reside en que la mayor o menor concentración que presente en el mosto afecta notablemente

A la velocidad del proceso fermentativo y a la estabilidad de la sidra elaborada y, por tanto, a su calidad. Con el fin de conocer el momento óptimo de madurez de la manzana, en la actualidad se vienen utilizando diversos parámetros tales como la concentración interna de etileno, el nivel de firmeza que presenta el fruto, la concentración en sólidos solubles y el test del yodo como medida aproximada del nivel de almidón, siendo la pérdida de firmeza y almidón y la ganancia en el contenido en sólidos solubles los parámetros que mejor se correlacionan con el nivel de madurez más adecuado para el consumo en fresco del fruto (BLANKENSHIP y UNRATH, 1988). Otros autores (BOARD y WOODS, 1983) establecen la madurez del fruto a partir de relaciones azúcar/acidez, dada la repercusión de estos parámetros en la calidad sensorial de las manzanas.

con el fin de conocer el momento óptimo de maduración de las mismas. Esto permitirá determinar la fecha de procesado más apropiada del fruto para la fabricación de los diferentes derivados de la manzana (sidra, zumo, aguardientes, etc.), en las condiciones adecuadas, lo que posibilitará la elaboración de forma regular de productos de elevada calidad sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de azúcares y ácidos orgánicos

El análisis individualizado de los azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa y sorbitol) y los ácidos orgánicos (málico, quínico y shiquímico) se ha efectuado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Blanco y col., 1987, 1986).

El sistema cromatográfico utilizado para el análisis de los azúcares estaba formado por: 1 bomba Waters mod. 510, 1 inyector automático Waters Wisp mod. 712 (10 µl de volumen de inyección), 1 detector IR Waters mod. 410, 1 baño termostático Selecta mod. Digiterm S-542 y un procesador de datos Digital mod. 380. La columna utilizada para la separación de las diferentes azúcares fue una Sugar Pak I (300 x 6,5 mm). La fase móvil empleada para la elución fue una disolución acuosa de 50 ppm de la sal cálcica del AEDT, microfiltrada y desgasificada mediante una corriente de helio con anterioridad a

su uso. Las condiciones de operación en el sistema cromatográfico fueron:

Flujo = 0,5 ml/min.

Temperatura de la columna = 60° C

Temperatura del detector = 37° C

Sensibilidad del detector = 32

Para llevar a cabo el análisis de los ácidos orgánicos se utilizó un sistema cromatográfico equipado con: 1 bomba LKB mod. 2150, 1 válvula de inyección Rheodyne mod. 7125 (loop = 20 μ l), 1 detector espectral LKB mod. 2140 y un procesador de datos IBM. La columna utilizada para la separación de ácidos fue una Spherisorb ODS-2 (250 x 4 mm) cargada con partículas de un tamaño de 5 μ m. La fase móvil empleada fue un tampón de dihidrógeno fosfato potásico 10^{-1} -M ajustado a pH = 2,25 con ácido fosfórico que, previamente a su uso, fue microfiltrado y desgasificado mediante una corriente de helio.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

Flujo = 0,5 ml/min.

Temperatura de la columna = 25° C

Longitud de onda de detección = 206 nm.

Otros métodos analíticos

Los azúcares totales fueron analizados por el método Bertrand. La sacarosa se hidrolizó previamente en medio ácido

(HCl 10%) a una temperatura de 75°C durante 20 minutos (INRA, 1973).

El nitrógeno total fue determinado, previa destilación del amoníaco sobre ácido bórico, por valoración con HCl (HACH y col., 1987; WATKINS y col., 1987).

El test del yodo se llevó a cabo según el método descrito por LEZEC y BABIN (1988), empleando 6,6 g/l de KI y 3,3 g/l de la.

Los compuestos fenólicos se analizaron por colorimetría midiendo a 700 nm, al hacer reaccionar la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio alcalino a 70°C durante 10 minutos (MONTREAU, 1972).

Preparación de la muestra

A lo largo de la maduración de cinco variedades de manzana: Raxao (ácida), Collaos (acidulada), Durón Arroes (dulce), Piconá Rayada (dulce-amarga) y Meana (amargo-acidulada), fueron muestreados entre 500 y 1000 g de manzana. Un cuarto de cada fruto fue mezclado con etanol absoluto y HCl concentrado en cantidades tales que las concentraciones finales fueron 80% y 1% respectivamente. Una vez mezclados el fruto, el etanol y el ácido clorhídrico, se efectuó la extracción de los componentes objeto de estudio bajo atmósfera inerte y durante 2 h. El extracto obtenido se filtró a través

de una membrana de vidrio porosa (G-3) y se lavó con etanol del 80%. Posteriormente, se redujo el volumen del extracto a 200 ml aproximadamente en un rotavapor y luego se enrasó a 500 ml con etanol del 80%. Antes de proceder a la inyección en el sistema cromatográfico, los extractos de manzana se microfiltraron mediante una membrana Millex de 0,45 µm y, para el caso de los azúcares, previamente se decoloraron a través de un Sep-Pak C₁₈ activado con metanol, con el fin de retener los pigmentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede ver en la figura 1, en las cinco variedades estudiadas la fructosa, sacarosa y glucosa, así como los azúcares totales, se acumulan al final de la maduración de la manzana. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por BERUTER (1985) y YAMAKI e ISHIKAWA (1986), los cuales estudiaron la acumulación de azúcares durante el desarrollo y maduración de la manzana así como los cambios experimentados por las enzimas estrechamente relacionadas con el metabolismo del sorbitol (Sorbitol-6P-deshidrogenasa, NAD⁺ y NADP⁺-Sorbitol deshidrogenasa y sorbitol oxidasa) y la invertasa ácida, las cuales influyen notablemente en la acumulación y degradación de los azúcares a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.

.La variación de los azúcares totales es similar a la de la fructosa dado que ésta es el azúcar mayoritario en manzanas

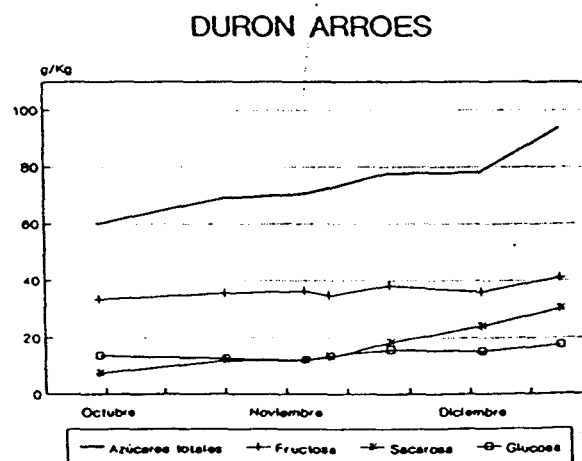
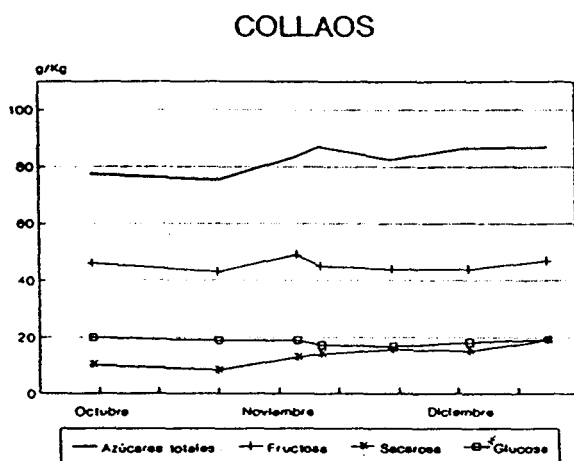
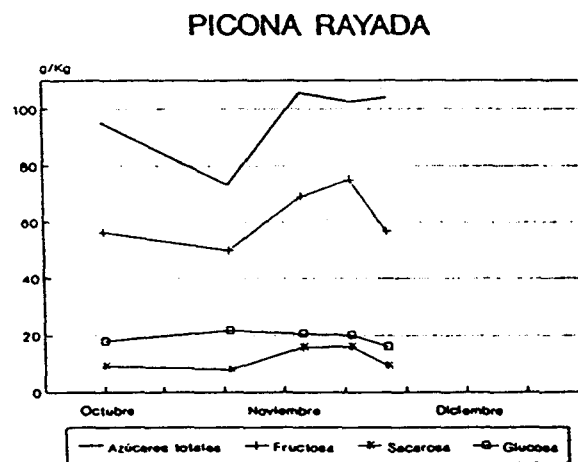
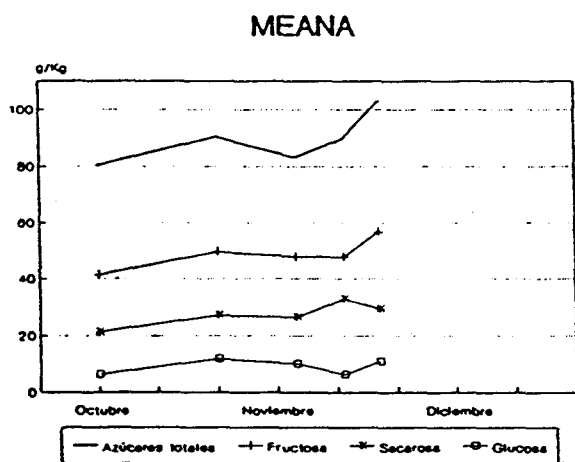
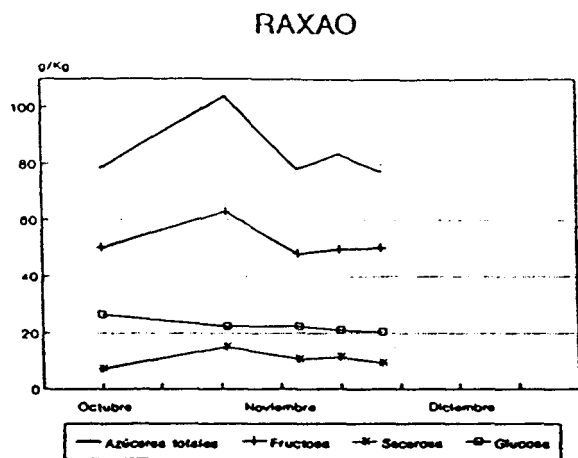


Figura 1. Evolución de los contenidos de azúcares mayoritarios y totales a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

Sin embargo, son de destacar ciertas diferencias en los perfiles de evolución de los azúcares individuales como una característica de cada variedad. Así, la variedad Raxao, presenta un máximo 15 días antes del momento óptimo de maduración, hecho éste también observable en el contenido en polifenoles, como se verá posteriormente, mientras que en la variedad Durón Arroes la mayor variación en los contenidos de azúcar es proporcionada por un cambio significativo en la concentración de sacarosa en la última etapa de la maduración. Es de destacar también que la variedad Meana presenta siempre, a lo largo de la maduración, un contenido superior en sacarosa que en glucosa, en contraste con las otras variedades.

Como era presumible, durante la fase final de la maduración no se han observado cambios notables en la concentración de sorbitol, manteniéndose en este período en los siguientes intervalos de variación: Collaos (3,06-4,57 g/Kg.), Durón Arroes (3,99-7,31 g/Kg.), Raxao (3,29-6,38 g/Kg.), Picon Rayada (2,93-5,73 g/Kg.) y Meana (2,61-4,49 g/Kg.).

Por otra parte, se ha determinado la evolución que experimentan los ácidos málico, quínico y shiquímico a lo largo de la maduración de las variedades antes mencionadas, comprobándose que el ácido shiquímico presenta pequeños cambios y que las variaciones más significativas vienen determinadas por los ácidos málico y quínico.

La evolución del ácido málico está caracterizada por una fuerte disminución paralelamente a la acumulación final de los azúcares (figura 2), lo que parece indicar que este ácido juega un papel importante tanto en los fenómenos de respiración como en la gluconeogénesis, tal como ha sido descrito para otros frutos por RIBEREAU-GAYON y PEYNAUD (1971).

Así mismo, se puede observar que el ácido quínico disminuye a lo largo de la maduración, lo que está de acuerdo con lo descrito por ULRICH (1970). Este descenso puede estar motivado por la síntesis del ácido clorogénico, producida a partir de los ácidos quínico y cafeico, previamente activado este último por el coenzima A (HAHLBROCK y GRISEBACH, 1979).

Se procedió también a evaluar el contenido en polifenoles y nitrógeno total durante la maduración de las citadas variedades, encontrándose que la variación en la concentración de los polifenoles a lo largo de ese período presenta un perfil similar en todas las variedades estudiadas (.figura 3), habiendo comprobado que el contenido en compuestos fenólicos pasa por un mínimo previamente a la acumulación final de los azúcares, excepto en la variedad Raxao que como ya se indicó, presenta un máximo, junto con los azúcares, 15 días antes de la maduración, para descender a continuación.

Este descenso en el contenido de polifenoles parece estar motivado por una movilización de los compuestos fenólicos

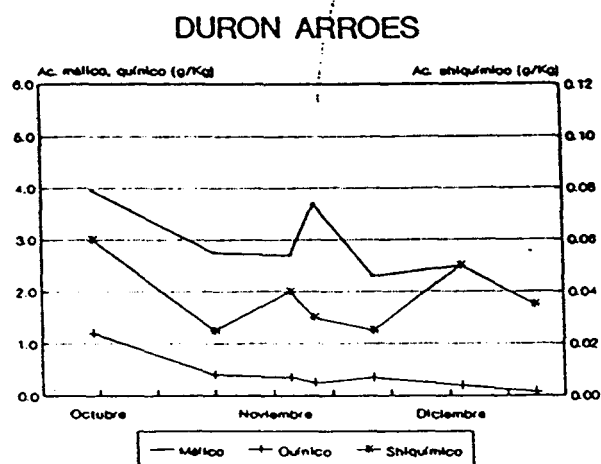
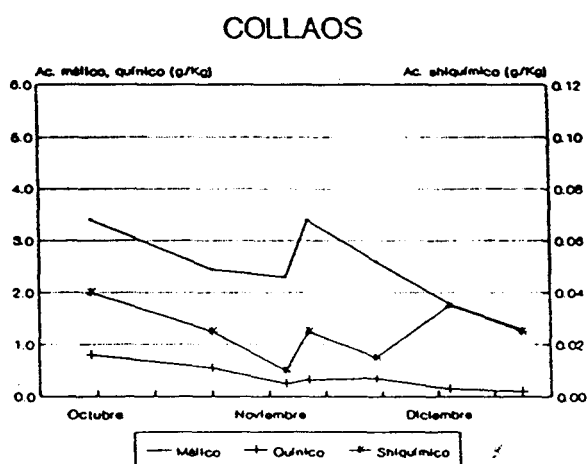
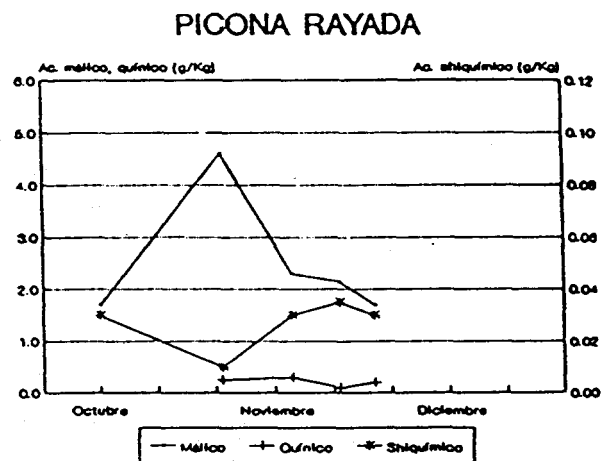
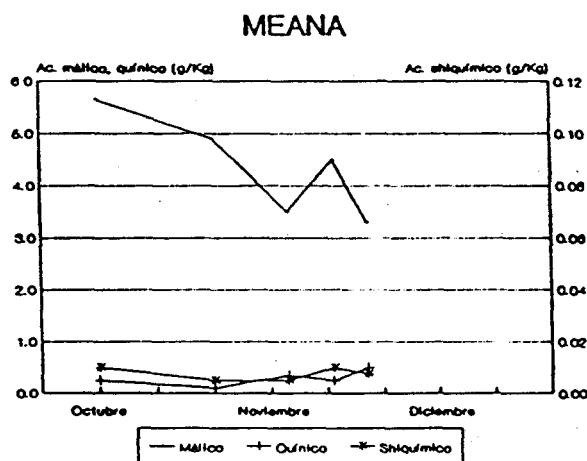
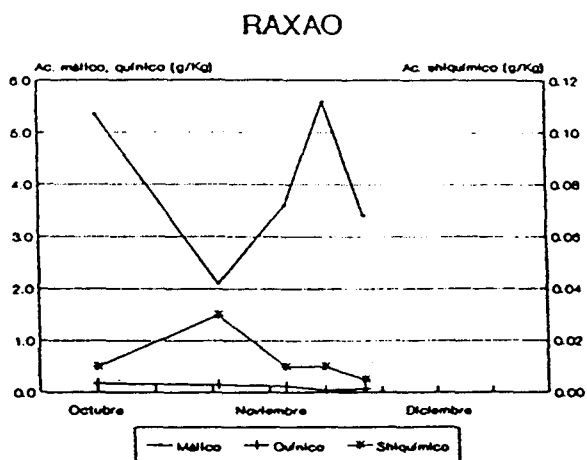


Figura 2. Evolución de los contenidos de los ácidos málico, quínico y shiquímico a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

Polifenoles totales

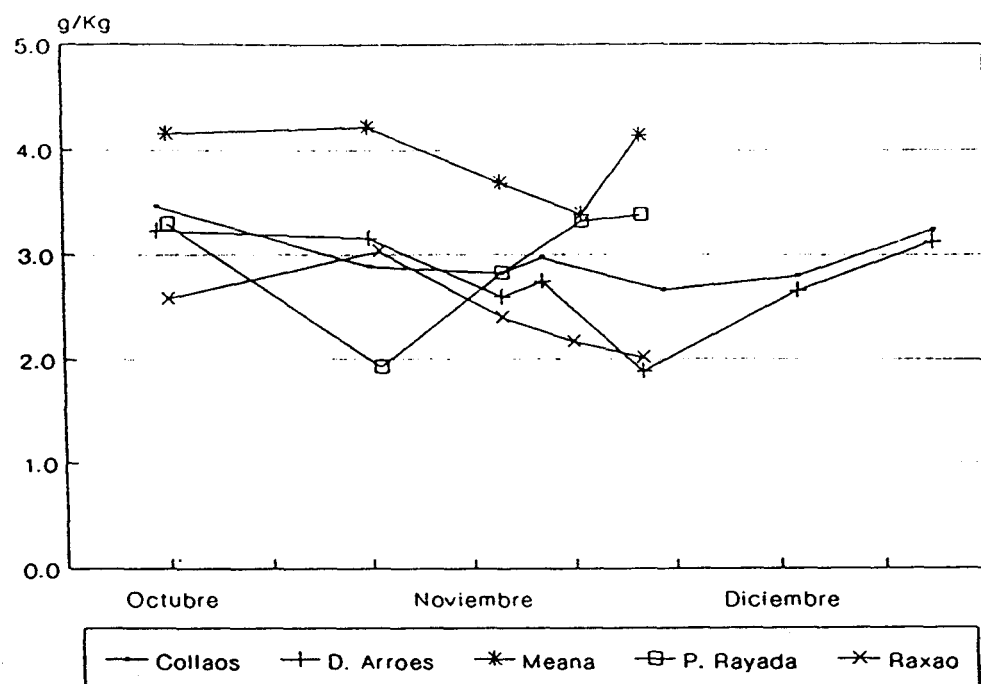


Figura 3. Evolución de los contenidos de polifenoles totales (índice Folin) a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

de bajo peso molecular, fundamentalmente flavanoles, hacia la formación de flavolanos de alto peso molecular (RIBEREAU-GAYON, 1964), cuyo nivel de extracción en las condiciones empleadas pudiera disminuir, tal como ha sido descrito por GOLDSTEIN y SWAIN (1963) para otros disolventes no acuosos como el metanol. Asimismo, la concentración de los ésteres cinámicos disminuye a lo largo de la maduración de la manzana (MACHEIX, 1974), lo que también contribuye al descenso del índice Folin, durante ese período.

Con respecto a la evolución en el contenido de nitrógeno total en las variedades estudiadas, en líneas generales sigue un perfil similar al descrito por BARON y col. (1982). observándose

un mínimo con anterioridad a la acumulación final de los azúcares (figura 4).

Fecha	Collaos	D. Arroes	Meana	Raxao	P. Rayada
14/10/87	-	5	3.6	2.3	-
22/10/87	3.6	-	-	-	-
29/10/87	3.6	5	2.4	1.6	-
10/11/87	2.9	5	2.1	0.6	0
19/11/87	1.3	4	0.4	0.2	-
30/11/87	0.8	-	-	-	-
2/12/87	0.3	4	0	0	-
9/12/87	0.7	3.2	-	-	-
14/12/87	0.5	3.4	-	-	-

Cuadro 1. Evolución del test del yodo a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

Nitrógeno

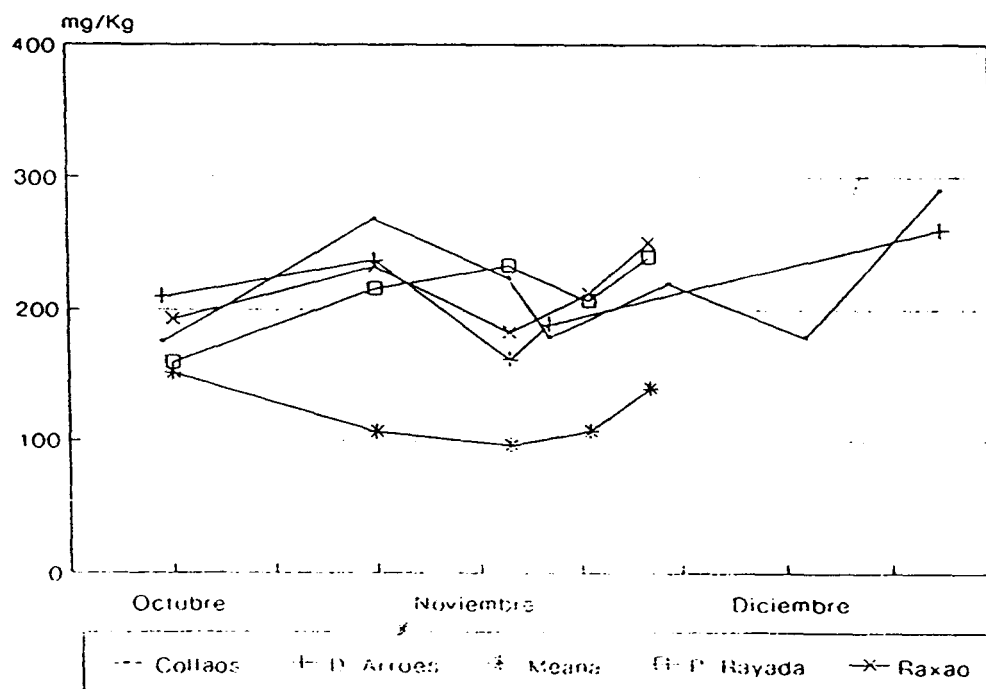


Figura 4. Evolución del contenido en nitrógeno total a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

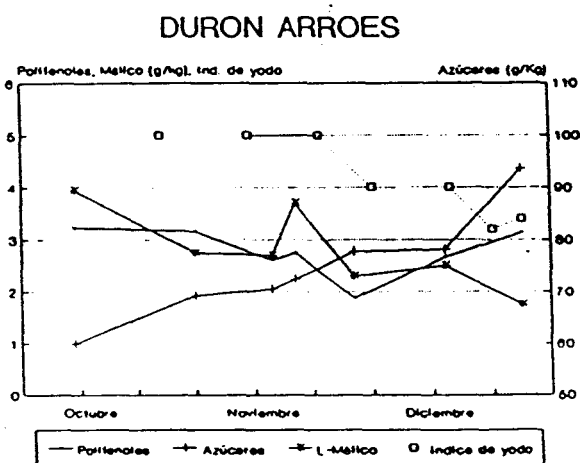
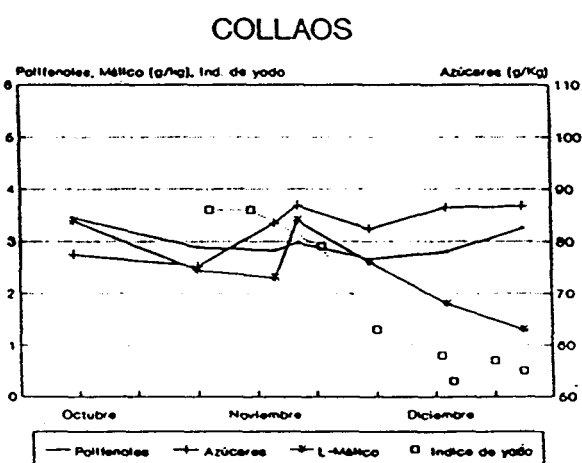
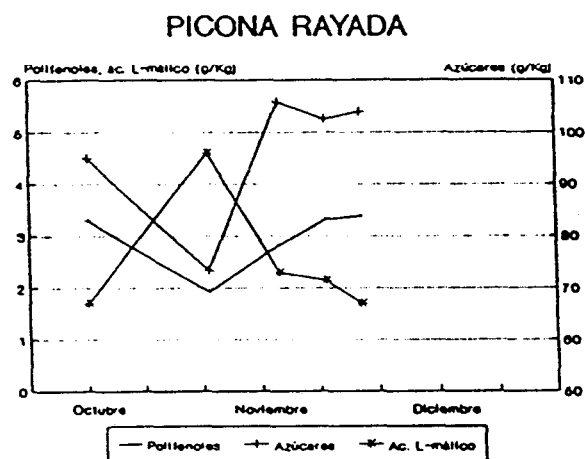
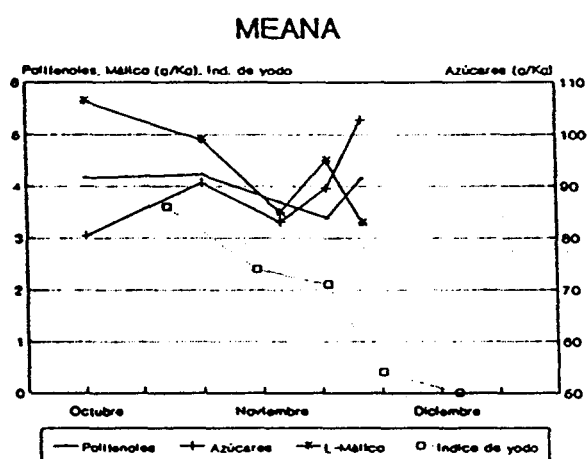
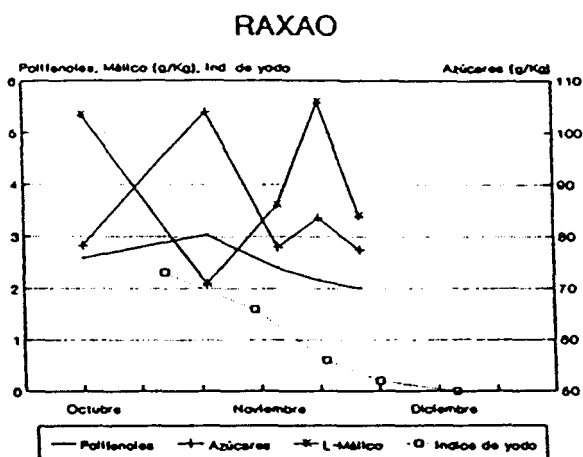


Figura 5. Evolución en los contenidos de polifenoles, azúcares totales, ácido málico y almidón a lo largo de la maduración de las cinco variedades de manzana.

Finalmente se comprobó la degradación experimentada por el almidón a lo largo de la maduración de los frutos mediante el test del yodo (Cuadro 1 y figura 5).

Como se puede observar, existe una disminución del valor del test a medida que el fruto madura. Se considera que entre los valores 2 y 1 la degradación del almidón es muy elevada, correspondiendo con el final de la maduración, y un cierto ablandamiento del fruto (MANGAS y col., 1990).

En conjunto, se puede observar que en el período próximo al momento óptimo de madurez fisiológica existe un perfil similar de evolución de los parámetros estudiados en las cinco variedades y se constata que, paralelamente a la degradación final del almidón (cobertura de tinción < 50% nivel 3), se produce un aumento de azúcares y un fuerte descenso del ácido málico que viene precedido de una disminución de los contenidos de compuestos fenólicos y nitrogenados (figuras 4 y 5).

Los resultados obtenidos nos llevan a plantear la necesidad de efectuar la recolección 10-15 días antes del momento óptimo de madurez, a fin de lograr que el procesado del fruto se efectúe en las mejores condiciones tecnológicas coincidiendo con la madurez fisiológica.

Se puede considerar que las fechas de maduración de las variedades estudiadas en la campaña de 1987-88 son las siguientes:

- Collaos: 25-30 Noviembre
- Durón Arroes: 25 de Diciembre - 5 de Enero.
- Meana: 13-20 de Noviembre
- Piconá Rayada: 1-5 de Noviembre
- Raxao: 3-10 de Noviembre

CONCLUSIONES

A lo largo de la maduración de las variedades de manzana estudiadas, se ha constatado que la evolución de los parámetros globales (nitrógeno, azúcares y polifenoles) y del ácido málico es similar en todas ellas.

Se ha observado que en las proximidades del momento óptimo de madurez de cada variedad existen cambios significativos en estos parámetros, por lo que la época de recolección puede condicionar notablemente el proceso de elaboración y la calidad de los productos derivados obtenidos, en particular de la sidra.

La aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución ha resultado de gran interés para el estudio individualizado de los azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios durante el transcurso de la fase final de la maduración de las citadas variedades. Nos ha permitido comprobar la existencia de un comportamiento diferenciado de la evolución de la glucosa, fructosa y sacarosa en las variedades estudiadas, habiéndose corroborado que la fructosa es el azúcar de reserva

va por excelencia que se acumula en la fase final de la maduración. Así mismo, se ha observado la interrelación que existe entre la elevada disminución del contenido de ácido málico y la acumulación final de los azúcares. También conviene señalar la disminución en el contenido del ácido quínico, debido probablemente a la síntesis del ácido clorogénico.

En relación a la evolución del test del yodo durante la maduración de las variedades, conviene señalar que se ha observado una disminución, del contenido en almidón en la fase final de la madurez, en concordancia con la acumulación final de los azúcares, y el fuerte descenso del ácido málico pudiendo considerarse por tanto un buen indicador del grado de maduración de cada variedad.

El conocimiento de la evolución de todos los parámetros anteriormente indicados (azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios, nitrógeno y polifenoles, test de yodo) nos han permitido determinar el momento óptimo de maduración de las variedades estudiadas, así como definir el período de recolección más adecuado para su posterior utilización en la elaboración de sidra, zumo y otros derivados de la manzana.

BIBLIOGRAFÍA

AMRHEIN N., HOLLANDER-CZYTKO H., LEIFELD J., SCHULTZ A., STEINRUCKEN H.C., TOPP H., 1982. Inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Bulletin de Liaison du Groupe Polyphenols 11: 21-30.

BABSKY N.E., TORISIO J.L., LOZANO J.F., 1986. Influence of storage on the composition of clarified apple juice concentrate. J. Food Sci. 51: 564-567.

BARON A., GOAS M., DRILLEAU J.M., 1982. Evolution, au cours de la maturation, des fractions azotées et des acides aminés dans la pomme et dans le moGt correspondant. Sci. Aliments. 2: 15-23.

BERUTER J., 1985. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of the apple fruit. J. Plant Physiol. 121: 331-341

BERUTER J., KALBERER P.P., 1983. The uptake of sorbitol by apple fruit tissue. Z. Pflanzenphysiol. 110: 113-125.

BLANCO D., GUTIÉRREZ M.D., MANGAS J.J., NOVAL A., 1968. Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by high performance liquid chromatography. Chromatographia. 25: 701-706.

BLANCO D., MORAN M.J., GUTIÉRREZ M.D., SANZ A., 1987. High performance liquid chromatography determination of major organic acids in apple juices and ciders. Chromatographia. 24: 347-350.

BLANKENSHIP S.M., UNRATH C.R., 1988. Internal ethylene levels and maturity of Delicious Golden and Golden Delicious apples destined for prompt consumption. J. Am. Soc. Hort. Sci. 113: 88-91.

BOARD P.W., WOODS H.J., 1983. Compositional variations and sensory acceptability of apple juice drink. J. Food Technol. 18: 763-769.

GIANFAGNA T.J., BERKOWITZ G.A., 1986. Glucose catabolism and anthocyanin production in apple fruit. Phytochemistry. 25: 607-609.

GOLDSTEIN J., SWAIN T., 1963. Changes in tannins in ripening fruits. Phytochemistry. 2: 371-383.

GROSS G.G., 1980. Enzymology of lignin biosynthesis. Bulletin of Liaison du Groupe Polyphenols. 10: 105-128.

HACH C.C., BOWDEN B.K., KOPELOVE A.B., BRAYTON S.V., 1987. More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 783.

HAHLBROCK K., GRISEBACH H., 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 105-130.

HANSEN P., 1970. ¹⁴C studies on apple trees. V. Translocation of labelled compounds from leaves to fruit and their conversion within the fruit. Physiol. Plánt. 23: 564-573.

HULME A.C., DONES J.D., WOOLTORTON L.S., 1963. The respiration climateric in apple fruits. Proc. Royal Soc. B. 158: 514-535.

INRA, 1973. Legislation et analyses usuelles des cidres et jus de pomme. Station de Recherches Cidricoles. Centre de Recherches Agronomiques de Rennes, France.

LAMPORT D.T., 1970. Cell wall metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 21: 235-270.

LE LEZEC M., BABIN J., 1988. Test de régression de l'amidon des pommes. L'arboriculture en val de Loire. Nov: 18.

LOESCHER W.H., MARLOW G.C., KENNEDY R.A., 1982. Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. Plánt Physiol. 70: 335-339.

MANGAS J.J., DAPENA E., SUÁREZ M., MORENO J., BLANCO D., GUTIÉRREZ M.D., 1990. Evolución del contenido de pectina a lo largo de la maduración y desarrollo de la manzana. Consecuencias prácticas para la recolección y posterior elaboración de sidra y otros derivados de la manzana. Información Técnica. Consejería de Agricultura y Pesca del Principado de Asturias.

MACHEIX J.J., 1974. Evolution de la teneur du fruit de *Pirus Malus* en esters des acides p-coumarique et caféique au cours de la croissance. Physiol. Vég. 12: 25-33.

MANSOUR R., LATCHE A., VAILLANT V., PECH J.C., REID M.S., 1986. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. Physiol. Plant. 66: 495-502.

MONTREAU F.R., 1972. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la methode Folin-Ciocalteu. Conn. Vigne Vin. 6: 397-404.

RIBEREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. III. Les tannins. Ann. Physiol. Vég. 6: 259-282.

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1971. Physiologie et biochimie de la vigne. Biochimie de la vigne et du raisin. In "Sciences et Techniques de la Vigne", vol. 1, Dunod Ed., París, p. 456.

ULRICH R., 1970. Organic acids_ In "The biochemistry of fruits and their products", A.C. Hulme (ed.), Academic Press, London, p. 104.

WATKINS K.L., TRYGVE L.V., KRAUSE G.F., 1987. Total nitrogen determination of various sample types: A comparison of the Hach, Kieltec and Kieldahl methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 6073.

YAMAKI S., ISHIKAWA K., 1986. Roles of four sorbitol related enzymes and invertase in the seasonal variations of sugar metabolism in apple tissue. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111: 134137.

