



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Research on the Aromatic Potential of Apples

Autora

María José Gracia Calvo

Directores

Vicente Ferreira González

Ricardo Javier López Gómez

Facultad de Veterinaria

2019/2020

---

A Vicente por haber confiado en mí para realizar este trabajo y guiarme en su ejecución.

A Elayma y Arancha por el tiempo invertido conmigo en el laboratorio para ayudarme a desarrollar este estudio.

A Ricardo por su gran disponibilidad, infinita paciencia, templanza y conocimientos enseñados, que siempre supo adaptar este trabajo frente las adversidades derivadas de la pandemia y mi disponibilidad horaria, haciéndolo así posible.

A mi familia por la ayuda incondicional prestada en el cuidado de mis hijos para poder hacer este Máster y a mi marido e hijos por todo el apoyo y alegría transmitida en los momentos difíciles.

A todos ellos y a todo el profesorado del Máster, Gracias.

## Resumen

El aroma es un elemento clave en la calidad de la manzana. Los compuestos responsables del aroma de manzana según la etapa de maduración son los aldehídos, alcoholes y ésteres. Estos son sintetizados a partir de aminoácidos y ácidos grasos, los principales precursores de las rutas metabólicas. La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la vía lipoxigenasa y el metabolismo de aminoácidos son las tres rutas más importantes de la biosíntesis del aroma de manzana. A parte de estos precursores existen unos compuestos “preodorantes”, formas muy solubles en medios acuosos y por tanto compuestos no volátiles procedentes de moléculas polihidroxiladas, ácidos, glicósidos o conjugados con aminoácidos. La liberación del odorante se produce mediante la rotura de un enlace, un rearrreglo molecular, un proceso de deshidratación o una combinación de ambos. En condiciones normales de temperatura estos procesos pueden tardar mucho tiempo en producirse de manera espontánea, pero en este trabajo se ha diseñado un proceso de aislamiento e hidrólisis acelerada en medio anóxico que permite acceder a una amplia gama de aromas procedentes de la fracción fenólica aromática (FFA).

## Abstract

The aroma is a key element in the quality of apples. According to ripening stage, aldehydes, alcohol and esters provide the compounds of apple's aroma. These compounds are synthesized from amino acids and fatty acids, the main precursors of many metabolic pathways. The  $\beta$ -oxidation of fatty acids, the lipoxygenase pathway and the metabolism of aminoacids are the three most important routes of apple flavor biosynthesis. Besides these precursors, there are some "pre-odorants" compounds. These are very water-soluble and non-volatile compounds from polyhydroxylated molecules, acids, glycosides or conjugated molecules with amino acids. The odorant compounds are derived from chemical bond breaking, molecular rearrangements or a combination of both processes. Under normal temperature conditions, these processes can take long time to occur spontaneously. However, in this study, those processes were accelerated by isolation and hydrolytic actions in an anoxic medium that allowed access to a wide range of aromas from the phenolic and aromatic fraction (PAF).

## Abreviaturas

AAT: Alcohol aciltransferasa

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ANOVA: Análisis de varianza

AldDH: Aldehído deshidrogenasa

BCAT: Enzima amino transferasa de cadena ramificada

BHA: Hidroxibutilanisol

CoA: Coenzima A

CoASH: Coenzima A con el grupo funcional sulfhidrilo

FFA: Fracción fenólica aromática

GC-MS: Cromatógrafo de gases-masas

GC-O-FID: Cromatografía de gases olfatometría con detector de ionización a la llama

GDH: Glutamato deshidrogenasa

HDH: Hidroxiácido deshidrogenasa

HPL: Hidroperóxido liasa

HPO: Hidroperóxido

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

LOX: Lipoxigenasa

LSD: Least Significant Difference

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

1-MCP: 1-metilciclopropeno

MEP: Vía de metileritritol fosfato

MVA: Vía de mevalonato

PDC: Piruvato descarboxilasa

SPE: Extracción en fase sólida

TDN: 1,1,6,-trimetil-1,2-dihidronaftaleno

Val: Valina

## Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Origen y Características de la Manzana	1
1.2. Economía de la Manzana en el Mundo, Europa y España	2
1.3. Bioquímica del aroma de manzana	4
<b>2. Objeto de Estudio</b>	<b>5</b>
<b>3. Revisión Bibliográfica</b>	<b>6</b>
3.1. Biosíntesis de compuestos volátiles en la manzana	6
3.2. Factores que afectan a la producción del aroma de manzana	10
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>13</b>
4.1. Materiales y reactivos	13
4.2. Control de calidad de la manzana	16
4.3. Preparación de la mistela	17
4.4. Extracción de la fracción fenólica y aromática	18
4.5. Condiciones de hidrólisis ácida	19
4.6. Análisis sensorial del aroma	20
4.7. Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría	21
4.8. Condiciones de hidrólisis enzimática	22
4.9. Condiciones de extracción por borboteo	22
4.10. Análisis de compuestos volátiles. Trazas	24
4.11. Tratamiento de datos	27
<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>28</b>
5.1. Control de calidad de la manzana	28
5.2. Análisis sensorial del aroma	30
5.3. Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría	33
5.4. Análisis de compuestos volátiles. Trazas	34
<b>6. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>7. Referencias Bibliográficas</b>	<b>43</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>1</b>
8.1. Anexo I	1
8.2. Anexo II	2
8.3. Anexo III	3
8.4. Anexo IV	4
8.5. Anexo V	5
8.6. Anexo VI	9
8.7. Anexo VII	13
8.8. Anexo VIII	16

## 1. Introducción

### 1.1. Origen y Características de la Manzana

Se desconoce el origen exacto del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Según V.V. Ponomarenko es *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem., una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media de hace unos 15.000 años, siendo la posible originaria de las razas cultivadas de manzano. En España el manzano fue introducido por los romanos (infoagro, 2020).

El manzano pertenece a la familia *Rosaceae*, especie: *Pyrus malus* L. Alcanza una altura de hasta 10 metros, tiene una vida de unos 60-80 años. Tiene un sistema radicular superficial. La floración tiene lugar en primavera, entre abril y mayo. La recolección óptima se realiza en otoño en los meses de septiembre y octubre aunque existen variedades precoces que se recolectan en julio y agosto y tardías que aguantan todo el invierno. El tiempo de recogida del fruto se encuentra supeditado al destino final de la fruta (InfoAgro, 2020).

La forma más habitual de la recolección es mecanizada empleando máquinas automáticas que pasan entre las líneas de plantación, provocando vibraciones intensas que hacen desprender los frutos. Otro sistema consiste en un bastidor de lona provisto de ruedas, el cual se empuja a mano y por medio del aparato eléctrico que provoca sacudidas a los árboles, hace caer los frutos a la lona (InfoAgro, 2020).

La manzana *Golden Delicious* se caracteriza por un fruto grande, de color amarillo dorado y con la carne blanca amarillenta, jugosa, perfumada y muy sabrosa. El pedúnculo es largo y la piel delgada y resistente, cubierta con lenticelas grisáceas. Es un fruto de buena conservación natural y en frío. Es sensible al mal blanco, moteado y pulgón lanífero. Resistente a chancro. Es una excelente polinizadora y muy productiva. Su recolección es en septiembre-octubre entre 135 a 150 días después de su floración, cuando cambia de color de verde oscuro a verde claro o verde amarillento y la pulpa se encuentra entre el 20 y 40 % libre de almidón (InfoAgro, 2020).

La temperatura óptima de conservación es entre 0 y 1°C, sufre quemaduras por congelación a partir de -1,7°C. La humedad relativa óptima es de 90 a 95%. La tasa de respiración y de producción de etileno aumenta conforme aumenta la temperatura (tabla 1).

Temperatura	0°C	5°C	10°C	20°C
Tasa de respiración (mL CO <sub>2</sub> / kg·h)	3-6	4-8	7-12	15-30
Tasa de producción de etileno (µL/ kg·h)	1-10	2-25	5-60	20-150

**Tabla 1:** Tasa de respiración y producción de etileno de la manzana *Golden Delicious* (InfoAgro, 2020).

Al tratarse de un fruto climatérico el etileno estimula su maduración, permitiendo recolectarlo antes de su pico de climaterio y almacenarlo en cámaras hasta 10 meses bajo condiciones de atmósfera controlada (1 a 3% O<sub>2</sub> + 1,5 a 3% CO<sub>2</sub>). Unos niveles de O<sub>2</sub> inferiores al 1% y de CO<sub>2</sub> superiores al 15% pueden inducir sabores extraños debido a metabolismo fermentativo (infoagro.com, 2020).

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) la composición nutricional de la manzana es la siguiente (tabla 2):

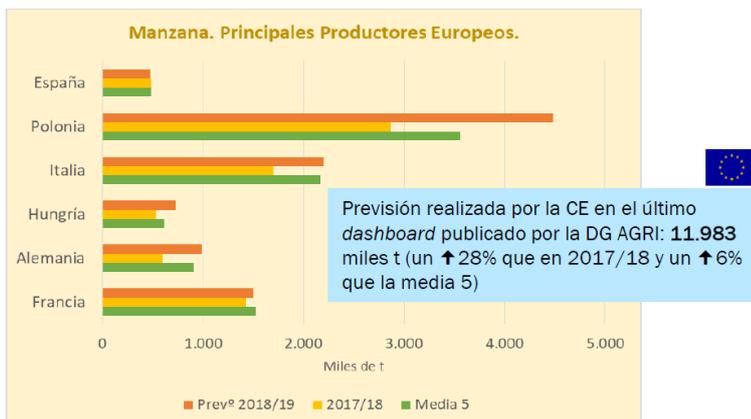
Por 100g de porción comestible					
Energía (Kcal)	53	Calcio (mg)	6	Tiamina (mg)	0,04
Proteínas (g)	0,3	Hierro (mg)	0,4	Riboflavina (mg)	0,02
Lípidos totales (g)	Tr	Yodo (µg)	2	Equivalentes niacina (mg)	0,2
AG saturados (g)	-	Magnesio (mg)	5	Vitamina B6 (mg)	0,03
AG monoinsaturados (g)	-	Zinc (mg)	0,1	Folatos (µg)	5
AG poliinsaturados (g)	-	Sodio (mg)	2	Vitamina B12 (µg)	0
ω-3 (g)	-	Potasio (mg)	120	Vitamina C (mg)	10
C18:2 Linoleico (ω-6)	-	Fósforo (mg)	8	Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	4
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	Selenio (µg)	Tr	Vitamina D (µg)	0
Hidratos de carbono (g)	12			Vitamina E (mg)	0,2
Fibra (g)	2				
Agua (g)	85,7				

**Tabla 2:** Composición total de la manzana (MAPA. Manzana, 2020).

## 1.2. Economía de la Manzana en el Mundo, Europa y España

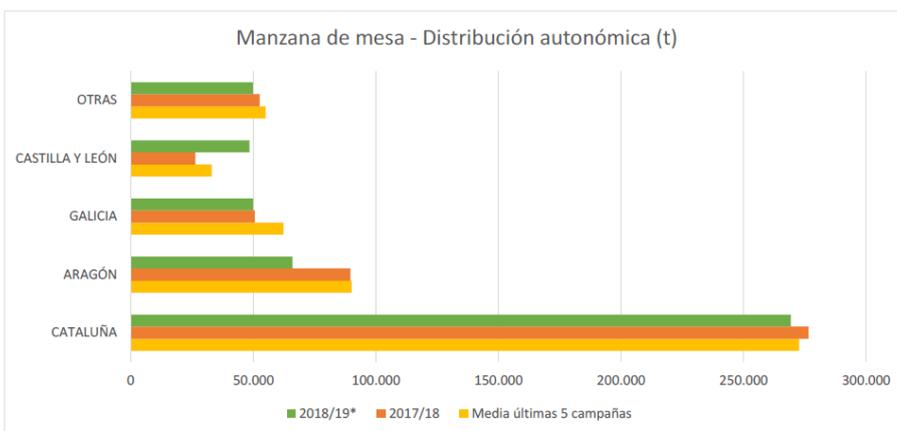
Según el informe *World: Apple-Market Report. Analysis And Forecast To 2025*, publicado por IndexBox, el mercado de la manzana en 2016 alcanzó una producción de 89,3 millones de toneladas. China fue el principal productor mundial con alrededor de 44,4 millones de toneladas, lo que representó la mitad de la producción mundial, el resto de productores fueron Estados Unidos (5%), Polonia (4%), Turquía (3%), India (3%), Irán (3%) e Italia (3%) (Fedefruta, 2018).

Según el informe publicado por el MAPA *Fruta de pepita campaña 2018-2019* los principales productores de manzana en Europa son Polonia (3.561 miles de toneladas), Italia (2.167 miles de toneladas) y Francia (1.572 miles de toneladas), situando a España en el sexto lugar con 485 miles de toneladas (atendiendo a la media de las 5 campañas comprendidas entre 2013/14 al 2017/18) (figura 1).



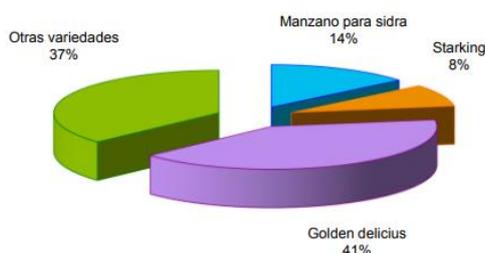
**Figura 1:** Principales países Europeos productores de manzana (MAPA, 2019).

En cuanto a España, Cataluña fue el principal productor de manzana de mesa con 271.701 toneladas seguido de Aragón con 90.016 toneladas (figura 2).



**Figura 2:** Distribución de la producción de las comunidades autónomas de la manzana de la manzana de mesa (MAPA, 2019).

Según los datos del MAPA en el *avance del 2019* de *Superficies y Producciones de Cultivos*, en 2018 la variedad *Golden Delicious* supuso el 41% del total de la producción de manzana en España, encabezando la producción respecto a otras variedades (figura 3).



**Figura 3:** Distribución de la producción de manzanas en España en 2018 (MAPA, 2019).

### 1.3. Bioquímica del aroma de manzana

Los compuestos aromáticos en la manzana se llevan estudiando hace más de 50 años, en este periodo se han identificado más de 400 compuestos (Forney et al., 2009), de los cuales solo unos pocos contribuyen significativamente al olor de la manzana y están presentes en partes por millón (Kays y Paull, 2004). En la biosíntesis de los compuestos aromáticos son los ácidos grasos y aminoácidos los principales precursores de las rutas metabólicas de las cuales se obtienen los aldehídos, alcoholes y ésteres. Algunas enzimas como la lipoxigenasa, alcohol deshidrogenasa y alcohol aciltransferasa son cruciales para la producción de estos compuestos volátiles.

El perfil de los compuestos aromáticos en la manzana cambia a lo largo del proceso de maduración, al principio predominan los aldehídos, seguidamente aumenta el contenido de alcoholes y finalmente son los ésteres los que dominan el perfil aromático de la manzana madura (Fellman et al., 2000). La composición y concentración de compuestos aromáticos volátiles difiere entre variedades, su producción, factores de cosecha y almacenamiento (López et al. 1998a).

Los aldehídos derivan principalmente del catabolismo de los ácidos grasos (De Pooter et al., 1986; Rowan et al., 1999), aunque también pueden formarse a partir de cadenas ramificadas de aminoácidos tales como isoleucina, leucina y valina (Rowan et al., 1996). Hay identificados más de 25 aldehídos en las manzanas aunque los mayoritarios son hexanal, trans-2-hexenal y butanal (Dimick et al., 1983). El contenido de aldehídos es más abundante en manzanas inmaduras (Vallat et al., 2005) y conforme avanza el proceso de maduración la concentración de estos disminuye (Mattheis et al., 2005; De Pooter et al., 1986).

Los alcoholes son formados por la reducción de los aldehídos mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Bartley et al., 1980). Los alcoholes lineales son producto del catabolismo de los ácidos grasos, mientras que los alcoholes ramificados son derivados del metabolismo de los aminoácidos ramificados (Gonda et al., 2010; Reineccius, 2006). Los alcoholes son los compuestos más importantes en la contribución del aroma de las manzanas maduras después de los ésteres (López et al., 2010). Siendo los más abundantes 2-metil-1-butanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-propanol y 2 metil-1-propanol (López et al.; 1998; Echeverría et al., 2004; Fellman et al., 2003). Estos son los precursores de los ésteres (Dimick et al., 1983), aunque que pueden ser ocasionalmente fragmentados en sus correspondientes alcoholes y ácidos grasos por la acción de esterases (Schaffer et al., 2007).

Por acción enzimática del alcohol aciltransferasa (AAT) los alcoholes se transforman en ésteres. Por cada grupo alcohol (R-OH) que se transforma en éster (R-COOR) la enzima AAT transforma un acil-CoA en acilo (St-Pierre et al., 2000). Esto ocurre en el catabolismo de los ácidos grasos y aminoácidos (Fellman et al., 2000; Bartley et al.; 1985; Defilippi et al.; 2005). En las manzanas

maduras los alcoholes constituyen entre el 6 y 16% de los volátiles totales (Paillard et al., 1990), mientras que los ésteres pueden suponer dependiendo la variedad de manzana el 80% en *Golden Delicious* y *Golden Reinder* (López et al., 1998a; Altisent et al., 2011) al 90% en *Starking Delicious* (López et al., 1998b). Los ésteres pueden tener cadenas lineales o ramificadas y su concentración depende de la disponibilidad de los precursores (Knee et al., 1981; De Pooter et al., 1981; Paillard et al., 1979) y de la selectividad y actividad de las enzimas implicadas (Echeverría et al., 2004; Souleyre et al., 2005). Los ésteres más importantes debido a su alto contenido e impacto en el aroma de varias variedades de manzana son: butil acetato, hexil acetato, 2-metilbutil acetato y etil 2-metil-butanoato (Dunemann et al., 2012).

## 2. Objeto de Estudio

Conociendo el mecanismo de las rutas bioquímicas que dan lugar a los compuestos aromáticos de la manzana y de la existencia de sistemas precursores que confieren el posterior desarrollo de moléculas volátiles de aroma de manzana, este trabajo centra sus principales objetivos en:

- Elaborar una revisión bibliográfica sobre la biosíntesis de los compuestos volátiles responsables del aroma de la manzana y estudiar los factores que influyen en el aroma de la manzana.
- Desarrollar un método para aislar y revelar los precursores del aroma de la manzana. Estudiar la producción de aromas a partir de los precursores mediante un análisis sensorial, medios instrumentales GC-MS y estadísticos.

### 3. Revisión Bibliográfica

#### 3.1. Biosíntesis de compuestos volátiles en la manzana

Los compuestos volátiles del aroma de manzana son sintetizados en el metabolismo de los ácidos grasos, aminoácidos e hidratos de carbono a través de las siguientes rutas:

- Aldehídos, alcoholes y ésteres de cadena lineal son sintetizados de lípidos, principalmente del ácido linolénico y linoleico mediante la  $\beta$ -oxidación y la actividad de la lipoxigenasa (Paillard et al.; 1990; Rowan et al., 1999).
- Aldehídos, alcoholes y ésteres de cadena ramificada son derivados de la isoleucina a través del metabolismo de los aminoácidos (Rowan et al., 1996; Hansen et al., 1993; Matich et al., 2007).
- Los terpenos son sintetizados por dos vías: la ruta del mevalonato (Schwab et al., 2008) y la ruta de desoxixilulosa fosfato (Eisenreich et al., 2004).
- Los fenilpropanoides son sintetizados por la vía fenilpropanoide (Gang et al., 2001)

Los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son los más predominantes en las manzanas (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3) siendo los principales substratos para la producción de volátiles. El contenido y concentración de lípidos de los ácidos grasos antes y después de la cosecha en el fruto climatérico de la manzana es similar, alcanzando su máxima concentración en el máximo climatérico (Galliard et al., 1968; Song et al., 2003; Meigh et al., 1965, 1967; Nie et al., 2005). La leucina, isoleucina y valina son los aminoácidos de cadena ramificada más importantes en la biosíntesis de compuestos aromáticos volátiles en la manzana (Defilippi et al., 2009; Tzin et al., 2010). La concentración de la mayoría de los aminoácidos decrece con la maduración de la manzana debido a la síntesis y metabolismo de proteínas (Ackermann et al.; 1992; Defilippi et al., 2005; Zhang et al., 2010; Sugimoto et al., 2011). Durante el almacenamiento, inicialmente tiene lugar una reducción del contenido de aminoácidos pero posteriormente se estabiliza sin cambio significativo (Ackermann et al., 1992). Por otro lado hay dos grupos principales de compuestos aromáticos provenientes del metabolismo de los carbohidratos: los terpenos y furanonas (Pérez et al., 2008).

##### ➤ Metabolismo de los ácido grasos

En las manzanas, la  $\beta$ -oxidación y la ruta de la lipoxigenasa (LOX) son los dos sistemas enzimáticos principales en el catabolismo de los ácidos grasos para la formación de aldehídos, alcoholes y ésteres (Echeverría et al., 2004; Defilippi et al., 2005), siendo el primero más importante en fruta intacta y el segundo en la fruta dañada (Sanz et al., 1997; Gardner, 1995). Sin embargo, a medida que la manzana madura, las tasas de síntesis y degradación de lípidos aumentan,

causando un cambio en la fluidez de la membrana, lo que aumenta su permeabilidad a diferentes sustratos (Bartley, 1985). Esto, junto con la descomposición de los cloroplastos, que liberan ácidos grasos como los ácidos linoleico (C18: 2) y linolénico (C18: 3) (Galliard, 1968), hacen que la vía LOX sea una alternativa a la  $\beta$ -oxidación en toda la fruta, confirmado por la alta actividad de los enzimas de la ruta LOX durante el desarrollo de la manzana (Echeverría et al., 2004; Villatoro et al., 2008).

### 1) $\beta$ -oxidación de ácidos grasos

La  $\beta$ -oxidación es la principal ruta involucrada en la degradación de los ácidos grasos, en las plantas se realiza principalmente en los peroxisomas, que contienen todas las enzimas necesarias. Durante la  $\beta$ -oxidación, los ácidos grasos se activan en su correspondiente acil coenzima A (CoA) por la acil-CoA sintetasa en una reacción que requiere adenosina trifosfato (ATP),  $Mg^{2+}$  y coenzima A con el grupo funcional sulfhidrilo (CoASH). El acil-CoA luego se importa al peroxisoma (Heldt, 2004; Baker, 2006).

El anexo I muestra las enzimas, cofactores y productos implicados en la degradación del ácido esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), a través de la vía de  $\beta$ -oxidación (Espino et al., 2016). La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga produce ácidos más cortos, como el ácido acético, butanoico y hexanoico, que se pueden reducir a sus correspondientes alcoholes (Rowan et al., 1996) antes de ser esterificados con acil-CoA por la enzima alcohol aciltransferasa (AAT). La combinación de moléculas de acil-CoA con diferentes alcoholes da como resultado una gama importante de ésteres. Sin embargo, dado que el acetil-CoA es el principal acil-CoA producido en la  $\beta$ -oxidación, la mayoría de los ésteres son de acetatos (Dixon et al., 2000).

### 2) Vía lipoxigenasa

La lipoxigenasa (LOX) es una dioxigenasa que cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que contienen una fracción de cis-1,4-pentadieno, siendo el producto un dieno conjugado (cis, trans) hidroperóxido (HPO). Los ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) son los principales sustratos de LOX, que se liberan de los triacilgliceroles, fosfolípidos y glicolípidos por la acción de las acil hidrolasas (anexo II) (Espino et al., 2016).

Los productos de la reacción LOX se pueden convertir en diferentes compuestos, a través de al menos seis rutas (Porta et al, 2002). Una de estas vías es a través de la enzima hidroperóxido liasa (HPL) (Feussner et al., 2001) (anexo II). HPL es una enzima que actúa sobre los hidroperóxidos sin necesidad de cofactores para formar aldehídos de cadena corta (6 o 9 átomos de carbono) (Schwab et al 2008).

Los aldehídos (6 o 9 átomos de carbono) se reducen posteriormente al alcohol correspondiente por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). La ADH es una oxidoreductasa que cataliza la

reducción reversible de aldehídos a alcoholes, y su dirección está influenciada por el pH. Sin embargo, a pH fisiológico, la reacción favorece la producción de alcoholes. ADH actúa sobre una amplia gama de alcoholes lineales, ramificados y cíclicos, en las manzanas actúa primero en los alcoholes lineales. La ADH también requiere de la presencia de las coenzimas reducidas NADH y NADPH (Sanz et al., 2010; Schwab et al., 2008; Dixon et al., 2000)

Los alcoholes resultantes de la actividad enzimática ADH son sustratos naturales para la enzima AAT, que transfiere un grupo acilo a través de una reacción dependiente de oxígeno de acil-CoA al grupo OH de un alcohol que forma un éster. La diversidad de los ésteres formados por las enzimas AAT puede verse influenciada por la disponibilidad del sustrato, la especificidad de la enzima o por la variedad de genes que codifican las enzimas ATT. Aunque la AAT tiene más afinidad por los alcoholes lineales que por los ramificados, debido a que el acetyl-CoA es el CoA más abundante en las frutas, como se ha citado anteriormente, la mayoría de los ésteres son de acetatos (López et al., 2010).

#### ➤ **Metabolismo de aminoácidos**

Los aminoácidos son precursores de compuestos aromáticos volátiles como aldehídos, alcoholes, ácidos y ésteres, siendo la segunda fuente la más importante en la obtención de compuestos volátiles en el aroma de frutas y verduras (Sanz et al., 2010). En las manzanas, se ha descubierto la producción de ésteres de cadena ramificada a partir de los aminoácidos ramificados isoleucina (Ile), leucina (Leu) y valina (Val) (Rowan et al., 1997). Estos aminoácidos, compuestos ramificados de naturaleza alifática, se sintetizan en los cloroplastos. Los aminoácidos libres en las células se originan de la proteólisis (Smit et al., 2009). La enzima amino transferasa de cadena ramificada (BCAT) cataliza el último paso en la síntesis de aminoácidos ramificados y el primer paso de su degradación (Diebold et al., 2002; Schuster et al., 2005). Leu, Val e Ile se degradan en las mitocondrias de las plantas aunque algunas de las enzimas requeridas del catabolismo de Leu e Ile también se han encontrado en los peroxisomas. La degradación de los aminoácidos ramificados ayuda a mantener el equilibrio entre  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Además, el acil-CoA producido sirve como fuente de energía para la producción de ATP (Smit et al., 2009).

El catabolismo de los aminoácidos ha sido documentado en bacterias y levaduras (Liu et al., 2008; Dickinson et al., 2000, 2003). En las frutas, se ha demostrado que las reacciones para la derivación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos ramificados siguen la vía que se encuentra en algunos de estos microorganismos. En las manzanas esta vía se ha demostrado mediante la adición exógena de aminoácidos marcados. La adición de Leu, Ile y Val etiquetados produce un patrón de éster diferente en diferentes variedades de manzana, lo que indica que las isoenzimas difieren en su selectividad de sustrato (Rowan et al., 1997).

En el anexo III se puede ver la formación de compuestos volátiles a partir del catabolismo de la isoleucina (Espino et al., 2016). En las manzanas y otras frutas, la biosíntesis de compuestos volátiles de Ile, Leu y Val comienza con la eliminación del grupo amino por las aminotransferasas (BCAT), formando ácidos  $\alpha$ -ceto (2-oxo-3-metilpentanoato y 2-oxo-3-metilbutanoato). Durante esta transaminación, los aminoácidos usan 2-oxo-cetoglutarato (2-oxoglutarato) como receptor para el grupo amino, que puede ser reciclado en glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Los  $\alpha$ -cetoácidos se pueden metabolizar por tres vías diferentes (Liu et al., 2008; Marilley y Casey 2004).

En la primera, los 2-oxoácidos se pueden convertir en aldehídos ramificados (2-metilbutanal, 3-metilbutanal y 2-metilpropanal, para Ile, Leu y Val, respectivamente) por carboxilación oxidativa por un  $\alpha$ -enzima cetoácido descarboxilasa (por ejemplo, piruvato descarboxilasa, PDC). Estos aldehídos se pueden reducir a su correspondiente alcohol ramificado (2-metilbutanol, 3-metilbutanol y 2-metilpropanol) por la acción de la enzima ADH, que utiliza  $\text{NAD(P)}^+$  como cofactor. La transformación de aminoácidos en alcoholes se conoce como la ruta de Ehrlich, en la que las enzimas clave son las transaminasas, descarboxilasas y deshidrogenasas. Los aldehídos ramificados también se pueden oxidar a su correspondiente ácido graso ramificado (2-metilbutanoico, 3-metilbutanoico y 3-metilpropanoico) por la acción de la aldehído deshidrogenasa (AldDH), que usa  $\text{NAD(P)H}$  como cofactor (Smit et al., 2009; Dickinson et al., 2000, 1998).

En la segunda vía, los 2-oxoácidos se pueden convertir en ácidos grasos por descarboxilación oxidativa. Primero, el  $\alpha$ -cetoácido se convierte irreversiblemente en un acil-CoA de cadena ramificada (2-metil butanoil-CoA, 4-metil butil-CoA y 2-metil propil-CoA de Ile, Leu y Val, respectivamente) por la acción de la  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH), que sustituye un  $\text{CO}_2$  del ácido 2-oxo por el cofactor CoA con reducción de  $\text{NAD}^+$ . Entonces, el acil-CoA se puede convertir en un ácido graso por acción de la fosfato acetiltransferasa (PAT). Los ácidos grasos ramificados se pueden transformar en alcoholes y ésteres mediante la reducción del ácido a su correspondiente aldehído. Los alcoholes formados por la ruta de Ehrlich pueden esterificarse con acil-CoA por AAT para formar ésteres de cadena ramificada (Smit et al., 2009; Espino et al., 2016).

En la tercera vía, los  $\alpha$ -oxoácidos también pueden reducirse a hidroxiácidos por una hidroxiácido deshidrogenasa (HDH), que es específica para cada  $\alpha$ -oxoácido. Los hidroxiácidos no contribuyen al aroma, pero permiten la conversión de  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$  (Smit et al., 2009; Ardö, 2006).

➤ **Terpenoides y fenilpropenos**

Los terpenoides se sintetizan a través de dos vías paralelas:

- Vía de mevalonato (MVA), que opera en el citosol y comienza con la condensación de dos moléculas de acetil – CoA.
- Vía de metileritritol fosfato (MEP) se activa en los plástidos y comienza con el piruvato y gliceraldehído 3-fosfato como precursores para formar 1-desoxilulosa 5-fosfato.

Ambas rutas MVA y MEP dan como resultado la formación de isopentil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMADP), intermediarios de los que se derivan todos los terpenos. Los sesquiterpenos (C15) y los triterpenos se producen a través de la vía MVA, mientras que los monoterpenos (C10), los diterpenos (C20) y los tetraterpenos (C40) se producen a través de la vía MEP. La conversión catalítica de los precursores de terpenos se lleva a cabo mediante enzimas terpeno sintasa (Espino et al., 2016)

Los monoterpenos y sesquiterpenos son los principales componentes aromáticos de la familia de los isoprenoides en la manzana. El sesquiterpeno ramificado acíclico (E, E)- $\alpha$ -farneseno, sintetizado principalmente en las capas de células epidérmicas e hipodérmicas de la fruta, es el más asociado con la fruta madura de manzana (Ju y Curry, 2000). Sin embargo, el  $\alpha$ -farneseno también se ha asociado con escaldaduras superficiales en la piel de varios cultivares de manzana (Rupansinghe et al., 1998). (E, E)- $\alpha$ -farneseno se produce durante el almacenamiento de la manzana y su producción disminuye después de aproximadamente 2 meses de almacenamiento. (Pechous y Whitaker, 2004).

Los fenilpropenos, como el eugenol, el estragol y el isoestragol, también contribuyen al sabor punzante y aromático de algunas variedades de manzana (*Ellison's Orange*, *D'Arcy Spice* y *Fenouillet*) o notas de anís en la *Royal Gala*. Estos compuestos se derivan de la vía fenilpropanoide (Yauk et al., 2015).

### 3.2. Factores que afectan a la producción del aroma de manzana

La composición y concentración de los compuestos volátiles que confieren el aroma característico de las manzanas se pueden ver alterados por los procesos pre y pos cosecha. A continuación se detallan los efectos de dichos factores:

➤ **Factores previos a la cosecha**

El aroma de una manzana depende en gran medida de la variedad. Las diferencias en las concentraciones de compuestos volátiles entre las diferentes variedades de manzana les dan un patrón de aroma característico. El acetato de butilo es el éster principal en *Golden Delicious* (Song et al., 1996), Manzanas *Royal Gala* (Young et al, 1996) y *Mondial Gala* (Lara et al., 2007).

Los factores ambientales como el clima, la ubicación geográfica y las prácticas agrícolas también pueden afectar la composición de los volátiles en la manzana (Fellman et al., 1997; Rizzolo et al., 1992).

Los compuestos volátiles del aroma no se producen en cantidades significativas durante el crecimiento de la manzana, pero aumentan durante el período climatérico, cuando la producción de etileno induce una serie de cambios físicos y químicos en la expresión de ciertos genes y la actividad de ciertas enzimas (Kalua et al., 2007; Lay et al., 1990). Si bien los ésteres totales se encuentran en concentraciones muy bajas cuando los niveles endógenos de etileno son bajos, la producción de éster aumenta rápidamente tan pronto como comienza la síntesis de etileno (Nie et al., 2005). Dado que la producción de ésteres está regulada por etileno, los inhibidores de esta hormona añadida en la etapa previa a la cosecha reducen la producción de volátiles en la fruta. El 1-metilciclopropeno (1-MCP) es un potente inhibidor de etileno. Se ha observado que su aplicación reduce la producción de volátiles en manzanas de diferentes variedades como *Golden Delicious* (Kondo et al., 2005), *Fuji* (Bai et al., 2005), *Gala* (Marin et al., 2009), *Anna* (Lurie et al., 2002) y manzana transgénica *Greensleeves* (Defilippi et al., 2004). 1-MCP reduce la transcripción y traducción del gen MdAAT2 en manzanas *Golden Delicious* con una disminución posterior en la producción de ésteres (Li et al., 2006).

➤ **Factores de cosecha**

La concentración de compuestos volátiles en la manzana aumenta considerablemente a medida que avanza la maduración (Mattheis et al., 1999). La madurez en el momento de la cosecha es uno de los principales factores que afectan a la calidad de la manzana durante y después del almacenamiento. La cosecha de manzanas antes de la madurez fisiológica normalmente implica bajos niveles volátiles (Song y Bangerth, 1993). Una manzana cosechada en una etapa climatérica producirá más volátiles durante el almacenamiento en comparación con una fruta preclimérica o una fruta demasiado madura (Brackmann et al., 1993).

➤ **Factores posteriores a la cosecha**

Las manzanas se pueden almacenar en atmósfera controlada durante varios meses. Sin embargo, las condiciones de almacenamiento pueden reducir la biosíntesis de compuestos volátiles en manzanas dependiendo del tipo de atmósfera empleada y la duración del período de almacenamiento (Brackman et al., 1993; Streif y Bangerth, 1988). Las atmósferas controladas, especialmente aquellas con oxígeno ultra bajo ( $P(O_2) < 1 \text{ kPa}$ ), causan una reducción en la biosíntesis de volátiles de cadena lineal debido a una reducción en la concentración de alcoholes y sus ésteres, excepto etanol y sus derivados, que se producen en la manzana en condiciones anaeróbicas (Harb et al., 2000). La síntesis y la degradación de los ácidos grasos también

disminuyen debido a la reducción de la  $\beta$ -oxidación, la actividad LOX y la biosíntesis de etileno (Both et al., 2014). Sin embargo, la disponibilidad de sustratos, es el factor más importante en la supresión de compuestos volátiles durante y después del almacenamiento bajo atmósfera controlada más que la falta de actividad enzimática (Lara et al., 2006, 2007). La baja concentración de oxígeno durante el almacenamiento tiene poco efecto sobre la biosíntesis de los ésteres ramificados (Harb et al., 2000; Argenta et al., 2004).

Por otro lado, el almacenamiento con una atmósfera con alta concentración de CO<sub>2</sub> suprime la producción de compuestos aromáticos lineales y ramificados, probablemente al inhibir el ácido tricarbóxico, del que derivan ciertos aminoácidos precursores (Brackmann et al., 1993). La reducción en la producción de aroma también puede deberse a una baja tasa de respiración en manzanas bajo atmósfera controlada, lo que puede agotar los metabolitos de energía almacenados como ATP y NADPH, necesarios para la biosíntesis y desaturación de ácidos grasos (Harwood, 1988; Saquet, 2003).

Durante la poscosecha, la concentración de ésteres puede disminuir debido a su hidrólisis por carboxilesterasas para formar sus respectivos ácidos y alcoholes, y por su difusión en el ambiente (Souleyre, 2011). Sin embargo, un bajo contenido de éster puede ser causado más bien por la falta de alcoholes como precursores que por la actividad esterases o la difusión (Fellman et al., 2000; Knee y Hatfield, 1981).

La aplicación exógena de sustratos de reacciones metabólicas como aldehídos, alcoholes y esterases, es una estrategia alternativa para la regeneración de aroma en manzanas refrigeradas. La disponibilidad del sustrato es un factor importante en la recuperación del aroma en las manzanas almacenadas durante largos períodos (Fellman et al., 2000; Lara et al., 2007). Se ha demostrado que los precursores agregados a las manzanas enteras se difunden hacia los tejidos internos de la fruta (De Pooter et al., 1981). Sin embargo, la aplicación exógena de sustratos en la manzana se ha utilizado más para dilucidar las vías metabólicas (Rowan et al., 1996, 1999) más que para aumentar la producción de compuestos volátiles (Maya et al., 2014).

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Materiales y reactivos

- Manzanas variedad *Golden Delicious* del proveedor Girona Fruits S.C.C.L. Origen: España. Calibre: 50. Cosecha 2019. Lote: 1120011601. El estudio inició en febrero con manzana madurada en cámara.

#### ➤ **Equipos**

- Balanza analítica HR-200 (A&D Weighing Co., EEUU).
- Balanza de granatario W Electronic Scale WT30001K (Want Balance Instrument Co., China).
- Cámara de anoxia AnaeroGen™ (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, EEUU).
- Centrífuga, Allegra X-22R (Beckman Coulter, Alemania).
- Colorímetro, Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta optics, INC., EEUU).
- Estufa Memmert 10-800 (Mettler GmbH & Co., Alemania).
- Licuadora industrial (LI-240 Sammic, España).
- Manifold a vacío, VacElut 20 Cartridge Manifolds (Agilent Technologies, California, EEUU).
- Penetrómetro, Digital Penetrometer Agrosta®14 Field (Agrosta SAS, Francia).
- pHmetros: pH-meter Basic 20+ y MicropH 2002 (Crison, España).
- Picadora (Braun 500Watt turbo, Alemania).
- Refractómetro, Digital Refractometer DBX-55A (Atago® CO, LTD, Japón).
- Rotavapor, Buchi R-215 equipado con una bomba de vacío V-700 (Buchi Labortechnik AG, Suiza).
- GC-MS: Cromatógrafo de gases: modelo GC-450 de Varian, acoplado a un detector de masas ion-trap Varian Saturn 2200 (Varian, EEUU).
- GC-O-FID: Cromatógrafo TraceGC gas chromatograph, Thermoquest (Milán, Italia), con puerto olfatométrico y detector por ionización a la llama (FID) (SGE Ringwood, Australia).

#### ➤ **Materiales**

- Bureta de 10, 25 mL (Duran®, Alemania).
- Cartucho C18, Sep-Pak® Vac 35cc (10g) (Waters, Massachusetts, EEUU). Acondicionado antes de su uso con 44 mL de metanol, seguido de 44 mL de agua milli-Q al 2% en etanol v/v.
- Cartucho de 3 mL de polipropileno (Varian Inc., EEUU).

- Embudo büchner de porcelana (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).
- Erlenmeyer de 250 mL (Duran®, Alemania).
- Frasco de vidrio de borosilicato con tapa roscada 1000 mL (Simax®, República Checa).
- Frasco de vidrio de borosilicato con tapa roscada 5000 mL (Borosil®, India).
- Filtro con placa de vidrio fritado (vidraFOC, España).
- Frits de polietileno para cartuchos de 3 mL (Supelco Inc., EEUU).
- Kuderna (HCS Scientific & Chemical Pte Ltd., Singapur).
- Kitasato 1000 mL (vidraFOC, Barcelona, España).
- Matraz aforado de 2, 10, 15, 50, 100, 200, 250 mL (Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Matraz esférico 1000 mL y matraz corazón de 10, 50, 250 mL (Fisher Scientific Inc., EEUU).
- Microjeringa de 10 µL (Hamilton Co., EEUU).
- Papel de filtro para embudo büchner MN 640 WE, diámetro 150 mm y poro 12-15 µm (Macherey-Nagel, Alemania).
- Pipetas de 5 y 10 mL (Globe Scientific Inc., EEUU)
- Pipeta *Pasteur* de vidrio (Labbox Labware S.L., España) y de plástico (Deltalab S.L., España).
- Resina Lichrolut EN (40-120 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania) para cartuchos.
- Parafilm M (Bemis Co., EEUU).
- Vaso de precipitados 25, 600 mL (Duran®, Alemania).
- Viales con inserto de 200 µL (ALWSCI Technologies Co., China).
- Viales de 2 y 20 mL, con cuello roscado y tapón roscado (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).
- Zapatilla de pesada (Scharlab S.L., España).
- **Reactivos**
- Ácido cítrico en polvo pureza del 99,5% (Sigma Aldrich, EEUU).
- Ácido clorhídrico HCl 1% v/v obtenido a partir de HCl 37% pureza (Panreac, España).
- Ácido málico sólido pureza del 99%, (Panreac AppliChem, Alemania).
- Agua purificada, Milli-Q purification system (Millipore, Massachusetts, EEUU).
- BHA, hidroxibutilanisol pureza 98,5% (SAFC Supply Solutions, Merck KGaA, Germany).
- Diclorometano 99,8% pureza, GLC-Pesticide residue grade (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).
- Etanol absoluto pureza 99,98% (VWR Chemicals, EEUU).
- Fenoltaleína en disolución al 1% v/v (PanReac AppliChem, Alemania).

- Fluoruro de sodio USP puro grado farma (PanReac AppliChem, Alemania).
- Hidrogeno fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Panreac AppliChem, Alemania).
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, solución estándar volumétrica (PanReac AppliChem, Alemania).
- Hidróxido de sodio (NaOH) pellets del 98% pureza (Panreac AppliChem, Alemania).
- Metanol ACS (Scharlab S.L., España).
- Rapidase AR 2000 (DSM Food Specialties Beverage Ingredients, Holanda).
- Sulfato de sodio anhidro 99% pureza, (Panreac AppliChem, Alemania).

➤ **Disoluciones elaboradas a partir de los reactivos**

- Disoluciones de NaOH 0,01 y 0,1% m/v obtenidas a partir de NaOH pellets.
- Disolución diclorometano/metanol 5% v/v. Para elaborar 15 mL se tomó 14,25 mL diclorometano y 0,75 mL metanol.
- Disolución de enzima Rapidase AR 2000 120 mg/mL. Se preparó 2 mL de disolución enzimática de 120 mg/mL pesando 240 mg.
- Disolución tampón citrato 0,1 M / fosfato 0,2 M. Para elaborar 20 mL se mezclaron 4,6 y 18,4 mL respectivamente de cada una de las disoluciones descritas a continuación, ajustando a pH 5 con disoluciones de NaOH 0,01 y 0,1% m/v y HCl 1% v/v:
  - Ácido cítrico 0,1 M ( $0,02 \text{ L} \times 0,1 \text{ M} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol}$ ;  $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 192,12 \text{ g/mol} = 0,384 \text{ g}$  pesados)
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M ( $0,02 \text{ L} \times 0,2 \text{ M} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol}$ ;  $4 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 141,96 \text{ g/mol} = 0,568 \text{ g}$  pesados).

## 4.2. Control de calidad de la manzana

Para el control de calidad de la manzana *Golden Delicious* (figura 4) se tomó como referencia el *Reglamento n° 543/2011, Parte B: Normas de comercialización específicas, Parte 1: Norma de comercialización para las manzanas*. A parte de las disposiciones establecidas en dicho reglamento, se analizaron los siguientes parámetros de calidad:



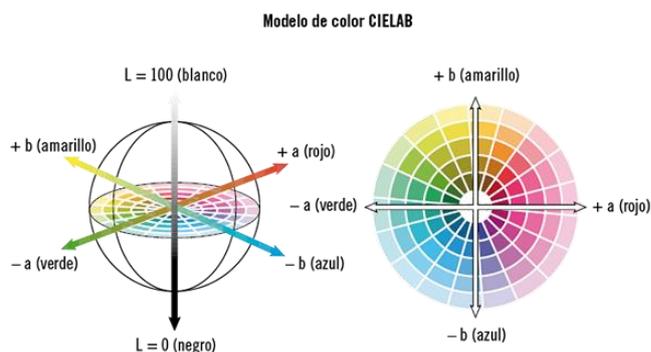
**Figura 4:** Manzana variedad *Golden Delicious* objeto de estudio.

### ➤ Color

Se escogieron 6 manzanas representativas y se realizaron 3 medidas en cada manzana. La colorimetría (figura 5) se realizó en la escala CIELab (L: luminosidad toma valores de 0-100; a\*: toma valores de -60 a +60, siendo -a\* verde y +a\* rojo; b\*: toma valores de -60 a +60, siendo -b\* azul y +b\* amarillo) (figura 6).



**Figura 5:** Colorímetro, Chroma Meter CR-400.



**Figura 6:** Escala CIELAB. (Twitchy, 2020).

### ➤ Firmeza

La firmeza se midió con un penetrómetro (figura 7) sobre 3 puntos en 6 manzanas representativas. Las zonas en donde se realizaron las mediciones fueron previamente peladas. La unidad de medida fue  $\text{kg}/\text{cm}^2$ .



**Figura 7:** Digital Penetrometer Agrosta@14 Field.

### ➤ Sólidos solubles

Para determinar el contenido sólidos solubles, se midió el índice de refracción (figura 8) sobre jugo de manzana clarificado expresado en °Brix, donde:

$$^{\circ} \text{Brix} = \frac{\text{g sacarosa en la muestra}}{100 \text{ g de muestra}}$$

Para la obtención de este jugo se licuaron 4 manzanas (756 g), se dejaron reposar durante 5 minutos en un vaso de precipitados de 600 mL para separar las fases (pulpa arriba y jugo abajo), se eliminó la pulpa sobrenadante y se tomó muestra del jugo de manzana para su medición con ayuda de una pipeta Pasteur. La medida se repitió 10 veces con distintas fracciones de la misma muestra del jugo de manzana.



**Figura 8:** Digital Refractometer DBX-55A, Atago.

### ➤ Acidez

Se midió el valor de pH (pH-meter Basic 20+) sobre 10 muestra de jugo de manzana clarificado. Para obtener la acidez se realizó una valoración ácido-base con hidróxido de sodio 0,1N y fenolftaleína como indicador. Se aplicó la siguiente fórmula considerando el ácido málico predominante en la manzana.

$$\text{Acidez (g ácido málico/L)} = \frac{\text{Vol. NaOH gastados (mL)} \times \text{N NaOH} \times \text{Peso equivalente ácido málico}}{\text{Vol. zumo (mL)}}$$

Se realizaron 5 valoraciones del jugo de manzana, tomando 10 mL de jugo diluyéndolo hasta 100 mL en un erlenmeyer de vidrio de 250 mL, se adicionaron 2-3 gotas de fenolftaleína y se valoró con NaOH 0,1N a un punto final de pH 8,2 con una bureta de 25 mL.

### 4.3. Preparación de la mistela

La manzana fría (10°C) se descorazonó y cortó a trozos grandes con un cuchillo cerámico. Posteriormente se trituró en medio inerte (flujo de N<sub>2</sub> para evitar la presencia de O<sub>2</sub>), en presencia del antioxidante BHA al 0,02% en peso y el protector enzimático fluoruro de sodio al 0,004% en peso sobre la manzana triturada. Se trituraron 3113,2 g de manzana.

Una vez triturada la manzana se trasvasó a un frasco de vidrio de borosilicato de 5000 mL y se adicionó etanol llevándolo al 15% en peso sobre la manzana triturada (figura 9). Se cerró el frasco herméticamente con rosca y se dejó macerar durante 6 horas a 15°C protegida de la luz, homogeneizando la mistela cada hora.



**Figura 9:** Manzana triturada con BHA + NaF y 15% etanol en peso.

Pasado el tiempo de maceración se centrifugó la mistela a 4500 rpm a 10°C durante 20 minutos. Se eliminó la parte sólida (parte inferior) y el sobrenadante (parte líquida) se filtró con placa de

vidrio fritado (figura 10), obteniendo 2,5 L de mistela, que fue almacenada a 5°C en 3 frascos de 1000 mL de vidrio de borosilicato con tapa roscada (figura 11) (Alegre et al., 2020).



**Figura 10:** Filtrado de la mistela tras maduración. **Figura 11:** Fracción de mistela filtrada.

#### 4.4. Extracción de la fracción fenólica y aromática

La mistela se filtró a vacío con un embudo büchner y papel de filtro. Posteriormente se desalcoholizaron 3 fracciones de 750 mL (790,8 g) de mistela filtrada en un matraz de 1000 mL en el rotavapor hasta el 2-3% etanol v/v, obteniendo un volumen final de 480 mL (253,0 g) (figura 12). La fracción resultante fue filtrada a vacío con un embudo büchner y papel de filtro. Para obtener la fracción fenólica aromática (FFA) se realizó una extracción en fase sólida semiautomatizada en un manifold a vacío, percolando el filtrado por un cartucho C18 (figura 13) previamente acondicionado. Una vez percolada la mistela se lavó el cartucho C18 con 88 mL de agua milli-Q a pH 3,8 (pH fruto de manzana, ajustado con HCl 1% v/v), posteriormente se secó haciendo pasar un flujo de aire a su través con un manifold a vacío. De las 3 fracciones desalcoholizadas se obtuvieron 2 puesto que una de ellas se desechó al colmatarse el cartucho C18.



**Figura 13:** Percolación de la mistela desalcoholizada en cartuchos de C18 con ayuda del manifold.

**Figura 12:** Desalcoholización de la mistela en el rotavapor.

Tras percolar y lavar las 2 fracciones de mistela desalcoholizada, se eluyeron los precursores aromáticos con 100 mL de etanol obteniendo la FFA y almacenándola a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se concentraron las 2 fracciones de FFA de 100 mL hasta 15 mL. Para ello se añadió 100 mL de FFA en un matraz corazón de 250 mL y se evaporó hasta obtener 20 mL, este extracto se trasvasó a un matraz de corazón de 50 mL, arrastrando los restos del extracto de FFA con etanol. Finalmente la muestra en el matraz corazón se concentró hasta 15 mL. Los 2 extractos de FFA de 15 mL se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas fracciones desaromatizadas contienen precursores aromáticos que bajo condiciones de hidrólisis formarán compuestos aromáticos (Alegre et al., 2020).

#### 4.5. Condiciones de hidrólisis ácida

Se reconstituyó una muestra de FFA en dos tipos de disoluciones hidroalcohólicas al 2 y 10% v/v etanol, ajustando su pH a 3,8 con ácido málico, ayuda del pHmetro (micropH 2002) y disoluciones de NaOH 0,01 y 0,1% m/v para ajustar al pH final. Se considera que la FFA es 100% etanol, ya que según se explica en el apartado anterior se eluyen los compuestos aromáticos del cartucho C18 con etanol. Se prepararon 200 mL de cada tipo de muestra de FFA reconstituía:

- FFA reconstituida al 2% etanol (200 mL): 4 mL FFA + 176 mL disolución ácido málico (5 g/L).
- FFA reconstituida al 10% etanol (200 mL): 4 mL FFA + 16 mL etanol + 180 mL disolución ácido málico (5 g/L).

Cada una de estas 2 fracciones de 200 mL se dividieron en 10 viales de 20 mL y se envasaron bajo condiciones de anoxia (figura 14). Se llenaron los viales en el exterior, se introdujeron en la cámara de anoxia donde se dejaron durante 10 minutos abiertos para que se reemplazara el oxígeno por el gas inerte (argón). Posteriormente se cerraron con tapa roscada, se envasaron a vacío en bolsas termoselladas y cada una de estas bolsas se introdujeron en otra que contenía carbón activo de AnaeroGen™ siendo también termosellada a vacío. Se envasaron 2 viales por bolsa, obteniendo 5 bolsas con 2 viales de 20 mL por cada una de las fracciones reconstituidas con la disolución hidroalcohólica 2 y 10% etanol v/v.



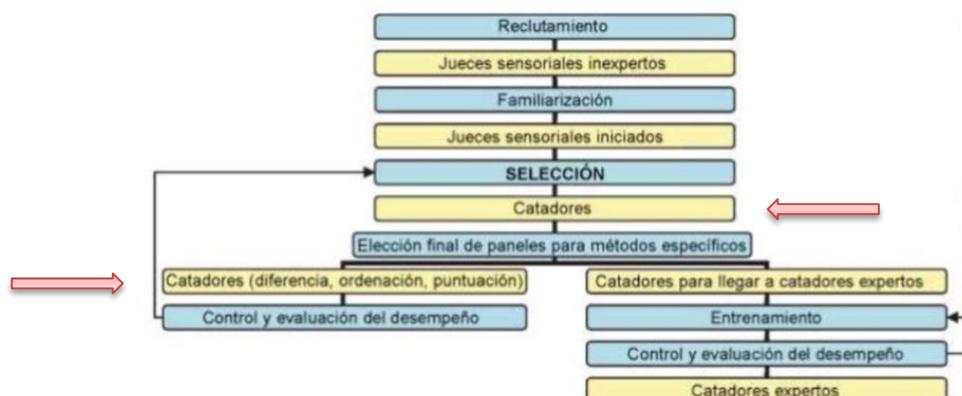
**Figura 14:** Embolsado de los viales de FFA del 2 y 10% etanol v/v en la cámara de anoxia.

Se realizó la hidrólisis ácida de las 10 parejas de las muestras (2 y 10% etanol v/v) incubando a 75°C en una estufa durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Una vez incubadas las muestras se almacenaron a 5°C para detener el proceso de hidrólisis (Alegre et al., 2020).

También se preparó y envasó a vacío un vial de 20 mL de FFA reconstituía al 2% etanol v/v el cual no se envejeció.

#### 4.6. Análisis sensorial del aroma

Se realizó un análisis sensorial de las muestras para determinar la presencia/ausencia de compuestos aromáticos generados tras la hidrólisis ácida de los precursores aromáticos. Se empleó un panel de 13 personas (7 hombres y 6 mujeres) pertenecientes al Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE), según la norma *UNE-EN ISO 8586:2016 análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento, control de catadores y catadores expertos*, se consideró un panel de tipo catadores ya que este personal está entrenado en análisis sensorial (figura 15).



**Figura 15:** Esquema del proceso completo de selección, entrenamiento, control de catadores y catadores expertos. UNE-EN ISO 8586:2016.

Se tomaron 5 muestras de FFA de cada concentración de etanol (2 y 10% v/v), para cada tiempo de hidrólisis a 75°C (2, 5, 10, 24 y 48 horas) (figura 16). Se pusieron en copas de vidrio negro con tapa y se presentaron a cada panelista en orden aleatorio haciendo dos rondas, una por cada serie de fracciones reconstituidas en disolución hidroalcohólica 2 y 10% etanol v/v.



**Figura 16:** Copas con muestra de FFA tras hidrólisis química.

Se pidió a los catadores que describieran 3 atributos de cada muestra y que evaluaran la intensidad global de olor de la muestra en una escala del 0 al 3 permitiendo puntos intermedios (0 =

olor no detectado; 1= olor débil, difícilmente detectable; 2 = olor claro pero no intenso; 3 = olor intenso) (Culleré et al, 2011).

A partir de los resultados del análisis sensorial:

- Se clasificaron los atributos descritos por familias de aroma según la lista de descriptores de aroma de LAAE (anexo IV).
- Se calculó de cada atributo descrito la frecuencia de detección acumulada (% F) definida como (Culleré et al, 2011):

$$\%F = \frac{n^{\circ} \text{ de veces detectado el descriptor en la muestra por los catadores}}{n^{\circ} \text{ total de catadores}} \times 100$$

#### 4.7. Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría

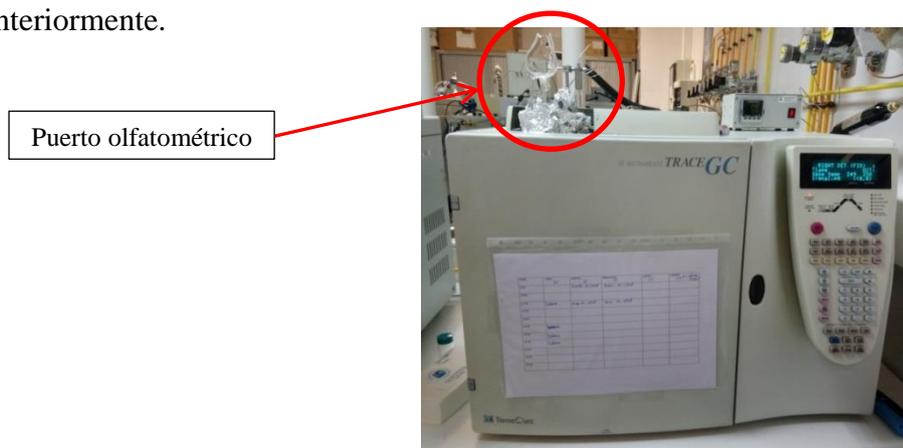
Para la caracterización de los aromas por cromatografía de gases-olfatometría con detector de ionización a la llama (GC-O-FID) (figura 17) se reconstituyó una muestra de FFA en disolución hidroalcohólica al 2% en etanol v/v por ser la que más compuestos se detectaron en el análisis sensorial. También se preparó un blanco sin FFA para eliminar el ruido de fondo en el análisis GC-O-FID. Se incubaron las muestras a 75°C durante 2, 10 y 48 horas para acelerar el proceso de hidrólisis química y una de ellas se reservó y no se sometió al proceso de envejecimiento.

Se elaboraron las siguientes muestras:

- 65 mL de nuestra blanco sin FFA para obtener 3 viales de 20 mL e incubarlos a 75°C durante 2, 10 y 48 horas respectivamente.
  - 50 mL de blanco (1 mL etanol + 250 mg ácido málico (5 g/L) + 30 mL agua milli-Q + ajuste de pH y enrase).
  - 15 mL de blanco (300 µL etanol + 75 mg ácido málico (5 g/L) + 12 mL agua milli-Q + ajuste de pH y enrase).
- 260 mL de muestra reconstituida con FFA al 2% en etanol v/v, para obtener 13 viales de 20 mL. De los cuales a un vial (20 mL) no se aplicó el tratamiento de hidrólisis y el resto correspondían a los tratamientos de 75°C durante 2, 10 y 48 horas (4 viales de 20 mL por cada tratamiento (240 mL)).
  - 250 mL de muestra con FFA (5 mL FFA + 1,25 g ácido málico (5 g/L) + 225 mL agua milli-Q + ajuste de pH y enrase).
  - 10 mL de muestra con FFA (200 µL FFA + 50 mg ácido málico (5g/L) + 8 mL agua milli-Q + ajuste de pH y enrase).

Para ajustar el pH de las muestras a 3,8 se utilizaron disoluciones de NaOH al 0,01 y 0,1% m/v.

Finalmente los viales de muestras se envasaron en las mismas condiciones de anoxia descritas anteriormente.



**Figura 17:** Equipo GC-O-FID, TraceGC gas chromatograph, Thermoquest.

#### 4.8. Condiciones de hidrólisis enzimática

Se tomó 40  $\mu\text{L}$  del extracto de precursores de FFA en un matraz corazón de 10 mL y se rotaevaporó hasta sequedad en baño termostatzado a 22°C (figura 18). Al extracto seco se añadió 9,2 mL de tampón citrato 0,1 M / fosfato 0,2 M y 800  $\mu\text{L}$  de disolución de enzima Rapidase AR 2000 a 120 mg/mL. Se desplazó el  $\text{O}_2$  del matraz corazón con una corriente de  $\text{N}_2$ , se cerró con parafilm y se incubó a 40°C durante 16 horas en una estufa.



**Figura 18:** Matraz corazón con FFA evaporada hasta sequedad.

Rapidase AR 2000 es una enzima con actividades secundarias glucosidasa específicas, transforma los precursores terpénicos no aromáticos en terpenoles libres aromáticos. Es una enzima pectolítica GRAS con actividades secundarias derivadas de *Aspergillus niger* (Creative Enzymes, 2020).

El hidrolizado enzimático de FFA se analizó por cromatografía de gases-masas (GC-MS) y se comparó con muestras de FFA sometidas a hidrólisis ácida.

#### 4.9. Condiciones de extracción por borboteo

Se realizó una extracción en fase sólida (SPE) con borboteo de la muestra de FFA según el artículo de Felipe San Juan y colaboradores de 2010. Para ello se preparó 100 mL de FFA al 2% etanol (2000  $\mu\text{L}$  FFA + 500 mg ácido málico (5 g/L) + 100 mL aprox. agua milli-Q (ajustando a pH a 3,8 y enrasando)), se metieron 80 mL de esta muestra de FFA en un sistema de extracción por

borboteo. En la parte superior del matraz borboteador se colocó un cartucho de polipropileno de 3 mL que contenía 400 mg de fase sólida Lichrolut EN (40-120  $\mu\text{m}$ ) sujeta con dos frits de polietileno. El cartucho fue previamente acondicionado con 20 mL de diclorometano (figura 19) y secado haciendo pasar una corriente de  $\text{N}_2$  a su través. En la otra entrada superior se conectó a una corriente de  $\text{N}_2$  a un caudal de 100 mL/min. Se mantuvo el sistema de extracción con borboteo durante 3 horas y 20 minutos (figura 20).



**Figura 19:** Acondicionamiento del cartucho.



**Figura 20:** Sistema de extracción por borboteo.

Una vez pasado este tiempo se desmontó el sistema de extracción, se cogió el cartucho y se secó haciendo pasar una corriente de  $\text{N}_2$ , hasta observar que la resina del cartucho estaba seca. Posteriormente se eluyeron los compuestos adsorbidos en la resina con 3,2 mL de disolución diclorometano/metanol 5% v/v gota a gota, recogiendo la muestra en un vial (figura 21). Para eliminar los restos de agua (causa de interferencias en la GC-O-FID) se añadió una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro, se agitó con suavidad y se dejó reposar. La muestra se trasvasó a un kuderna con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio para no coger el sulfato de sodio y se concentró con una corriente de  $\text{N}_2$  hasta 200  $\mu\text{L}$  (figura 22). La muestra concentrada se llevó a un vial con inserto y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .



**Figura 21:** Elución de los compuestos.



**Figura 22:** Concentración del extracto en un kuderna.

Tras la preparación de la muestra no se pudo analizar por GC-O-FID (figura 17) y comparar con las muestras de FFA sometidas a hidrólisis química debido a la situación de pandemia.

#### 4.10. Análisis de compuestos volátiles. Trazas

##### ➤ Preparación de muestra

Para el análisis de trazas se utilizaron las siguientes muestras:

- FFA reconstituida al 2% etanol v/v + ácido málico (5 g/L) (ajustado a pH 3,8) e hidrolizada a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas (5 muestras elaboradas en el apartado 4.5. *Condiciones de hidrólisis ácida*).
- FFA reconstituida al 10% etanol v/v + ácido málico (5 g/L) (ajustado a pH 3,8) e hidrolizada a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas (5 muestras elaboradas en el apartado 4.5. *Condiciones de hidrólisis ácida*).
- Blanco sin FFA al 2% etanol v/v + ácido málico (5 g/L) (ajustado a pH 3,8) hidrolizado a 75°C durante 2, 10, 48 horas (3 muestras elaboradas en el apartado 4.7. *Análisis por cromatografía de gases-olfatometría*).
- FFA reconstituida al 2% etanol v/v + ácido málico (5 g/L) (ajustado a pH 3,8) sin hidrolizar (FFA Golden 1) (1 muestra elaborada en el 4.5. *Condiciones de hidrólisis ácida*).
- FFA reconstituida al 2% etanol v/v + ácido málico (5 g/L) (ajustado a pH 3,8) (FFA Golden 2) sin hidrolizar (1 muestra, elaborada en el apartado 4.7. *Análisis por cromatografía de gases-olfatometría*).
- FFA tras hidrólisis enzimática (1 muestra, elaborada en el apartado 4.8. *Condiciones de hidrólisis enzimática*).
- Dos muestras control “a y b” para conocer los factores de respuesta de los compuestos, así como su identificación.

Para el tratamiento previo que se realizó a todas las muestras antes de ser inyectadas y las condiciones de análisis en el cromatógrafo de gases-masas (GC-MS) se siguió el procedimiento del LAAE (P-Trazas-Protocolo, 2019):

Se adicionó a un matraz aforado de 15 mL, 7 mL de muestra, posteriormente sin tocar las paredes del matraz se añadió sobre la muestra 100 µL de estándares internos (3-octanona, 2-octanol, 3,4-dimetilfenol) y se enrasó muestra hasta 15 mL. Esta disolución se trasvasó a un reservorio situado en serie con el cartucho de 65 mg de resina LiChrolut EN a través de un adaptador y se hizo pasar los 15 mL de muestra a una velocidad  $\approx 2$  mL/min, con la ayuda del sistema de vacío. El cartucho de resina fue previamente acondicionado con 2 mL de diclorometano, 2 mL de metanol y

otros 2 mL de disolución hidroalcohólica ajustada al 12% de etanol v/v (12 mL de etanol en 100 mL de agua milli-Q) empleando vacío.

Una vez percolada la muestra se lavó con 1,5 mL de disolución agua/metanol al 30% v/v, conteniendo un 1% en peso de NaHCO<sub>3</sub>. Se secó el cartucho empleando vacío para eliminar los posibles restos de agua. Se eluyó con 600 µL de diclorometano conteniendo un 5% de metanol. La elución se llevó a cabo gota a gota. El eluato se recogió en un vial de 2 mL y a continuación se trasvasó con la ayuda de una pipeta Pasteur a un vial de 200 µL con inserto para ser inyectado al cromatógrafo de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS).

➤ **Equipo y método cromatográfico**

Las características del cromatógrafo gases-masas utilizado fueron las siguientes:

- Cromatógrafo de gases: modelo GC-450 de Varian, acoplado a un detector de masas ion-trap Varian Saturn 2200.
- Columna: DB-WAX UI de Agilent de 60 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm de espesor de fase. La columna estaba precedida por una precolumna desactivada de 3 m x 0.32 mm d.e. de Agilent Technologies, EEUU.
- Inyector: Varian 1079, con liner splitless de 2 mm diámetro interno, suministrado por Supelco, EEUU.

En cuanto a las condiciones de inyección se trabajó en modo splitless cerrado (t splitless: 0-2,20 min) y luego splitless abierto (split 1/20) de 2,20-5,0 min y se inyectó 2 µL de muestra. Con un pulso de presión de 30 psi (tiempo pulso 2,18 min). El programa de inyección se encontró inicialmente a 40°C durante 0,05 minutos, a continuación se subió con una rampa de temperatura de 200°C/min hasta 300°C y se mantuvo durante 50 minutos. Pasado este tiempo se descendió la temperatura hasta 200°C con una rampa de temperatura de 200°C/min y se mantuvo durante 68 minutos.

Respecto al método cromatográfico se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1,5 mL/min. El programa de temperatura del horno fue inicialmente de 35°C con un tiempo de espera de 3 min, a continuación se subió hasta 220°C con una rampa de temperatura de 2°C/min sin tiempo de espera, finalmente se subió hasta 240°C con una rampa de temperatura de 20°C/min manteniendo esta temperatura durante 30 min.

La adquisición de resultados se realizó en modo barrido de 35 a 220 m/z. En la tabla 3 se muestran los compuestos químicos analizados, con su tiempo de retención (tr) en minutos, el estándar interno (SI) de referencia y las relaciones masa/carga (m/z) empleadas para su cuantificación.

SI	tr (min)	Compuesto	m/z
2-Octanol	19,767	Hexanal	82
2-Octanol	33,483	(E)-2-Hexenal	55
SI	37,933	3-Octanona	99
2-Octanol	41,267	(E)-2-Hexenal	98
2-Octanol	47,067	2-Octenal	108
2-Octanol	50,283	(E,E)-2,4-Hexadienal	95
2-Octanol	50,517	(E)-2-Undecenal	57
3,4-DMF	55,150	(E)-2-Hexen-1-ol	67
SI	57,033	2-Octanol	45
2-Octanol	62,167	Oxido de (E)-linalool	93
2-Octanol	64,800	Decanal	81
2-Octanol	66,100	Epóxido de alcohol de lila	129
2-Octanol	67,633	Cis-vitispirano	192
2-Octanol	67,900	Trans-vitispirano	177
2-Octanol	68,517	(E)-2-Nonenal	84
2-Octanol	70,333	Linalool	93
2-Octanol	70,900	Geranil isovalerato	71
2-Octanol	73,017	Norisoprenoide sin identificar 1	193
2-Octanol	73,317	Anhídrido del ácido hexanoico	99
2-Octanol	78,533	$\beta$ -Germacreno	97
2-Octanol	83,933	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	96
2-Octanol	84,567	$\gamma$ -Heptalactona	85
2-Octanol	85,167	$\alpha$ -Terpineol	136
2-Octanol	85,600	Verbenona	107
2-Octanol	86,683	Valenceno	133
2-Octanol	87,067	Norisoprenoide sin identificar 2	192
2-Octanol	87,733	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	119
2-Octanol	88,783	TDN	157
2-Octanol	89,867	$\alpha$ -Farneseno	123
3,4-DMF	96,350	$\beta$ -Damascenona	121
2-Octanol	98,617	Ácido hexanoico	73
2-Octanol	101,017	Alcohol bencílico	79
3,4-DMF	104,167	2-Feniletanol	91
2-Octanol	106,617	3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	163
3,4-DMF	108,067	2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	83
3,4-DMF	111,733	3-Metilfenol	107
3,4-DMF	125,000	3-Alil-6-metoxifenol	164
SI	129,200	3,4-Dimetilfenol	122
3,4-DMF	153,233	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	208
2-Octanol	153,917	Vainillina	151

Tabla 3: Listado de los compuestos analizados por GC-MS.

Se obtuvieron los datos de las áreas absolutas de los compuestos en la muestras y con los estándares internos se calcularon las áreas relativas para poder comparar entre los distintos compuestos.

$$\text{Área relativa} = \frac{\text{Área absoluta}}{\text{Área estándar interno}}$$

Para procesar los datos de las áreas relativas se agruparon los compuestos analizados en las familias: Aldehídos, alcoholes, ésteres, terpenos, sesquiterpenos, norisoprenoides y misceláneas.

Para la caracterización del olor de los compuestos se utilizó la base de datos de pubchem perteneciente al “*National Center for Biotechnology Information*”.

#### **4.11. Tratamiento de datos**

Para la identificación e integración de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos de las muestras obtenidas por las señales del cromatógrafo, se utilizó el programa MS Data Review (Varian, Inc, EEUU). Para el cálculo de las áreas relativas y graficado se utilizó Microsoft Excel 2010. En el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa XLSTAT 2018 estudiándose la normalidad de los residuos con la prueba de Shapiro-Wilk y realizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores completos (concentración de etanol en la muestra 2 y 10% y tiempo de hidrólisis a 75°C de 2, 5, 10, 24, 48 horas) sin termino de interacción

Para el tratamiento de datos del análisis sensorial y graficado se utilizó Microsoft Excel 2010.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Control de calidad de la manzana

Atendiendo al Reglamento nº 543/2011 la manzana de la variedad *Golden Delicious*, obtenida de *Malus domestica Borkh* destinada en estado fresco al consumidor cumplía con:

➤ **Disposiciones relativas a la calidad:**

- Requisitos mínimos de calidad: Las manzanas se encontraban intactas, sanas, limpias, exentas de plagas, daños causados por plagas, vidriosidad, humedad, olores y sabores extraños.
- Requisitos de madurez: Presentaban un desarrollo suficiente y se encontraban en un estado de maduración satisfactorio. Con el fin de comprobar los requisitos de madurez se determinaron los parámetros de color, textura, sólidos solubles y acidez descritos a más adelante.
- Clasificación: Se trataba de una manzana de categoría I.

➤ **Disposiciones relativas al calibre:**

- El calibre de la manzana era de 50 mm con un peso medio de 78 g, inferior al dispuesto de 60 mm o 90 g, pero aceptado por tener los frutos un valor medio de 14,61 °Brix, superior al marcado en la legislación de manzanas admitidas con calibre más pequeño de 60 mm o 90 g, siempre y cuando superen los 10,5 °Brix y el calibre sea igual o superior a 50 mm o 70 g.

➤ **Disposiciones relativas a las tolerancias:**

- Tolerancia de calidad: En la categoría I se admite una tolerancia del 10%, en número o en peso, de manzanas que no satisfagan los requisitos de esta categoría, pero que se ajusten a los de la categoría II, en este caso el 100% de las manzanas cumplían con la categoría I.
- Tolerancia de calibre: La tolerancia permitida es del 10 %, en número o en peso, de manzanas que no satisfagan los requisitos de calibre. Esta tolerancia no puede ampliarse para incluir productos con un calibre 5 mm o más por debajo del diámetro mínimo, 10 g o más por debajo del peso mínimo. La tolerancia de calibre de las manzanas objeto de estudio fue del 5%.

➤ **Disposiciones relativas a la presentación:**

- Homogeneidad: Las manzanas analizadas eran homogéneas del mismo origen, variedad, calidad, calibre y del mismo grado de madurez.
- Envasado: Las manzanas se adquirieron en una barquilla de madera con cartones entre las capas de manzanas que protegían al producto del daño externo. El envase se encontraba limpio y exento de materias extrañas.

➤ **Disposiciones relativas al mercado:**

- En el exterior de la barquilla de madera se encontraba la etiqueta identificativa del producto en donde se indicaba: la identificación del proveedor (Girona Fruits S.C.C.L.), la naturaleza del producto (Manzana Golden), origen (España), características comerciales (categoría I, calibre 50mm) y adicionalmente marcaba la cosecha 2019 y el número de lote: 1120011601.

Debido a que no existe legislación respecto los parámetros de calidad estudiados a continuación, los resultados se comparan con publicaciones y recomendaciones científicas.

➤ **Color**

Los valores medios obtenidos en la colorimetría fueron:  $L = 73,68$ ;  $a^* = -9,78$ ;  $b^* = 51,04$ . Comparándolos con los valores obtenidos en el estudio de la manzana *Golden Delicious* de Ornelas y colaboradores del 2018, en donde  $L = 71,5$ ;  $a^* = -19,73$ ;  $b^* = 39,07$  en manzanas cosechadas 137 días después de su floración (máximo climatérico); la mayor diferencia residía en el parámetro  $b^*$ , teniendo una clara tonalidad amarilla en la manzana objeto de estudio y verdosa en la del artículo.

➤ **Firmeza**

El valor medio de la textura fue de  $3,278 \text{ kg/cm}^2$ . Considerando el documento del MAPA sobre *la calidad de manzanas y peras* (Delhom MJ, 1985) donde recomienda que la variedad *Golden Delicious* tenga un valor de firmeza entre  $6,8-7,7 \text{ kg/cm}^2$  en el momento de la recolección y superior a  $5-5,4 \text{ kg/cm}^2$  en el momento de venta al consumidor y el artículo de Ornelas y colaboradores donde obtienen un valor de  $7,1 \text{ kg/cm}^2$ , en manzanas recolectadas tras 137 días después de la floración (máximo climatérico) y de  $6,4 \text{ kg/cm}^2$ , en manzana recolectadas tras 167 días después de la floración (manzana en etapa de senescencia). El valor de firmeza obtenido se puede considerar bajo, menor que el del artículo y el recomendado por el Ministerio en el momento de consumo. Hay que recordar que el inicio del estudio se realizó en febrero y las manzanas adquiridas fueron maduradas en cámara, lo que podría explicar el bajo valor de firmeza.

➤ **Sólidos solubles**

El valor medio de sólidos solubles fue de  $14,61^\circ\text{Brix}$ . Según las recomendaciones del MAPA sobre *la calidad de manzanas y peras*, el valor de la manzana *Golden Delicious* debe ser superior a  $13^\circ\text{Brix}$ . Por otro lado en el estudio de Ornelas y colaboradores obtenían un valor máximo postcosecha de  $11,6^\circ\text{Brix}$  (manzanas recolectadas 167 días tras la floración). Comparando estos datos con la manzana estudiada, se puede decir que el contenido de sólidos solubles totales era adecuado.

➤ **Acidez**

El valor medio obtenido de pH fue de 3,8. Para cálculo de la acidez se obtuvo un volumen medio consumido de NaOH 0,1N de 5,46mL y sustituyendo en la fórmula:

$$\text{Acidez (g ácido málico/L)} = \frac{5,46 \text{ mL} \times 0,1\text{N} \times 67,05}{10 \text{ mL}} = 3,66 \text{ g/L}$$

Se obtuvo una acidez de 3,66 g/L, inferior a la recomendación del MAPA (Delhom MJ, 1985) de igual o superior a 5 g ácido málico/L, probablemente debido a su maduración en cámara.

## 5.2. Análisis sensorial del aroma

En la tabla 4 se puede observar los resultados de las frecuencias de detección acumuladas de los descriptores aromáticos de las muestras de FFA del 2 y 10% etanol v/v. Los descriptores mayoritarios en ambos tipos de muestras son: olores desagradables (off-flavors) (suma de los descriptores: cartón/polvo, sotobosque, caucho, alquitrán/asfalto, hidrocarburo y animal) y frutas blancas. Seguido de frutas pasas/compotadas, vegetales frescos y metálico para la muestra de FFA 2% etanol v/v y de alcohol, frutas compotadas y vegetales frescos para la muestra de FFA 10% etanol v/v.

Descriptores	2 h 2%	2h 10%	5 h 2%	5h 10%	10 h 2%	10h 10%	24 h 2%	24h 10%	48 h 2%	48h 10%
Olores desagradables	51	39	54	62	46	41	23	38	41	23
Frutas blancas	23	23	38	54	77	38	54	38	38	38
Frutas pasas/compotadas	23	15	23	15	31	31	38	31	46	31
Vegetales frescos	31	8	15	0	38	0	15	23	15	15
Metálico	8	8	15	8	8	0	8	15	15	8
Floral	8	0	8	8	15	0	0	15	15	15
Hierbas secas	15	8	0	0	8	0	8	8	8	0
Cítrico	0	0	8	0	0	0	23	0	8	8
Torrefacto	0	0	8	8	15	0	8	0	8	8
Espicias	0	0	0	8	8	0	8	8	8	0
Frutas negras	8	0	0	0	0	0	8	0	0	0
Alcohol	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Frutas Tropicales	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Disolvente	8	0	0	8	0	8	0	8	0	8
Mantequilla/lácteo	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anís	0	0	0	8	0	0	8	8	0	8
Medicinal	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
Madera	0	8	0	0	0	0	0	0	8	8
Alcohol	0	31	0	15	0	54	0	15	0	46

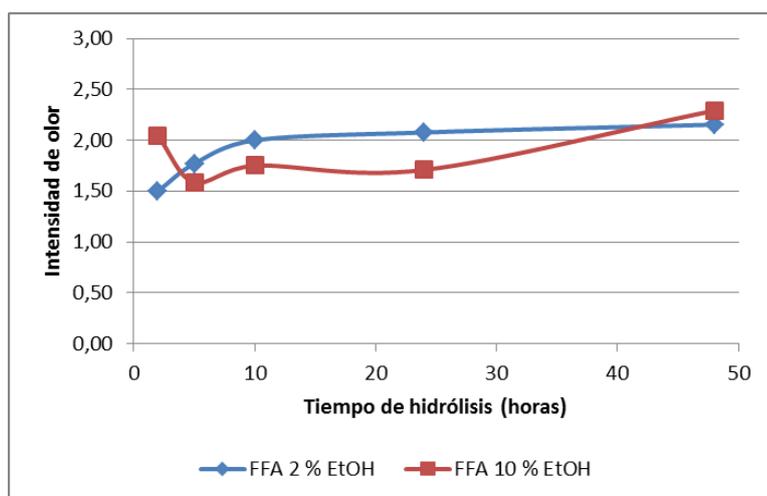
**Tabla 4:** Descriptores de la muestras de FFA 2 y 10% etanol tras la hidrólisis a 75°C y a los tiempos de 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Los resultados están expresados con % F.

La intensidad media de olor de las muestras se observa en la tabla 5. En la muestra de FFA 2% etanol v/v se ve como al aumentar el tiempo de envejecimiento aumenta la intensidad global de olor, pudiendo ser debido a que al aumentar el tiempo de hidrólisis ácida a 75°C se liberan más compuestos aromáticos (figura 23). En la muestra de FFA 10% etanol v/v también se observa un aumento de la intensidad global de olor al aumentar el envejecimiento pero con la excepción del tiempo 2 horas, pudiendo ser debido al enmascaramiento con los olores desagradables.

	2 h 2%	2h 10%	5 h 2%	5h 10%	10 h 2%	10h 10%	24 h 2%	24h 10%	48 h 2%	48h 10%
<b>Media intensidad olor (escala 0-3)</b>	1,50	2,04	1,77	1,58	2,00	1,75	2,08	1,71	2,15	2,29
<b>Desviación estándar</b>	0,76	0,78	0,73	0,63	0,71	0,40	0,53	0,58	0,69	0,62
<b>Coefficiente de variación (%CV)</b>	51	38	41	40	35	23	26	34	32	27

**Tabla 5:** Media, desviación estándar y coeficiente de variación de la intensidad de olor de las muestras de FFA al 2 y 10% etanol envejecida a 75°C durante 2, 5, 10, 24, 48 horas.

Las diferencias no son estadísticamente significativas, pero en la FFA con el 2% etanol, se observa que hay una tendencia en la que aumenta la intensidad de olor durante primeras las 10 horas (figura 23).



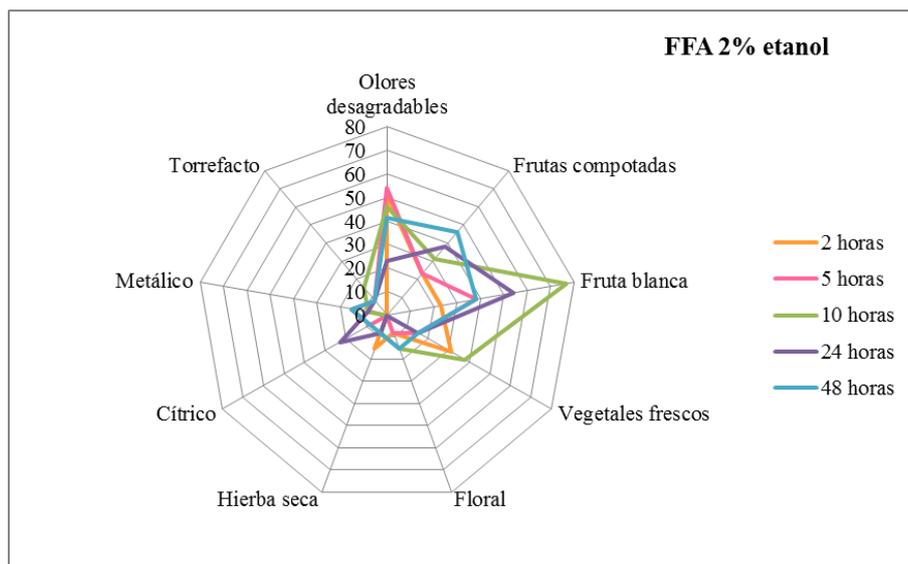
**Figura 23:** Representación de la media de la intensidad global de olor en cada muestra (escala 0-3) frente al tiempo de hidrólisis a 75°C de las muestras de FFA 2 y 10% etanol.

En los diagramas de telaraña de las figuras 24 y 25 se puede observar como en la muestra de FFA 10% etanol v/v hay mayor liberación de olores desagradables, los catadores resaltaron este hecho en las observaciones, así como que en dicha fracción tenían dificultad para detectar los descriptores por el mayor porcentaje de alcohol. Es por ello que se eligió la FFA de 2% etanol v/v para la caracterización de los aromas por GC-O-FID, aunque finalmente no se pudo llevar a cabo debido a la situación de pandemia.

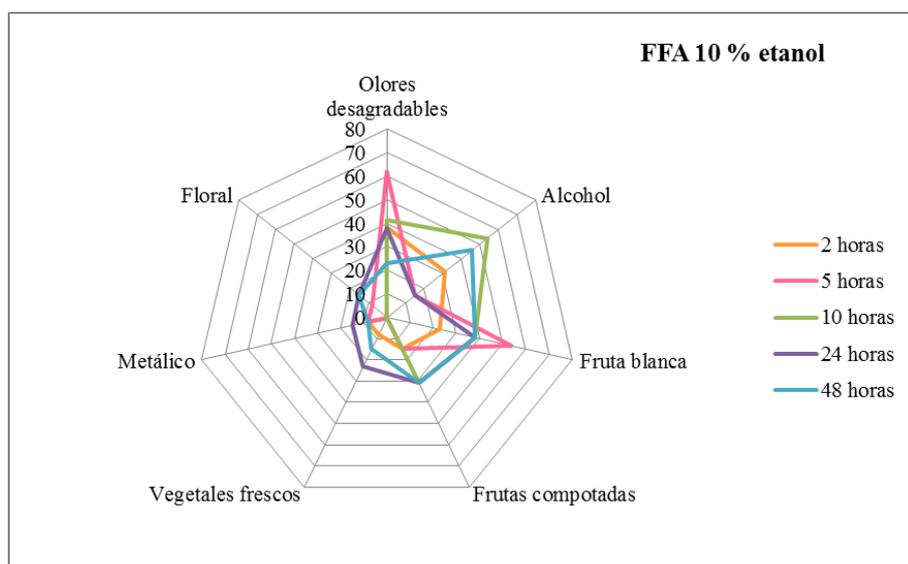
En la figura 24 se puede observar como en la muestra de FFA 2% etanol v/v envejecida 10 horas son mayores los descriptores afines al fruto fresco de la manzana (fruta blanca, vegetales frescos), seguido de las 24 horas de envejecimiento y siendo también menor la proporción de olores desagradables. A las 48 horas aumentan mucho los descriptores desagradables disminuyendo los

descriptores de fruta blanca y vegetales frescos. En cuanto a las muestras de FFA de 10% etanol v/v (figura 25) el tiempo de 5 horas contiene mayor proporción del descriptor fruta blanca.

En cuanto al descriptor de frutas compotadas es más evidente su detección en las muestras de FFA de 2% etanol v/v, en concreto en la fracción de 48 horas con mayor tiempo de envejecimiento, seguido de las fracciones de 24, 10, 5 y 2 horas.



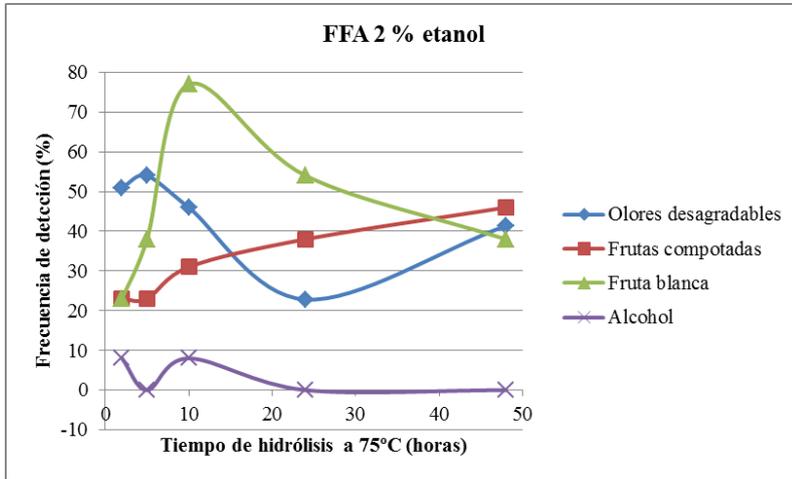
**Figura 24:** Representación de los descriptores de la muestra de FFA 2% etanol tras la hidrólisis a 75°C a los tiempos de 2, 5, 10, 24, 48 horas que muestran una frecuencia acumulada igual o superior al 15%.



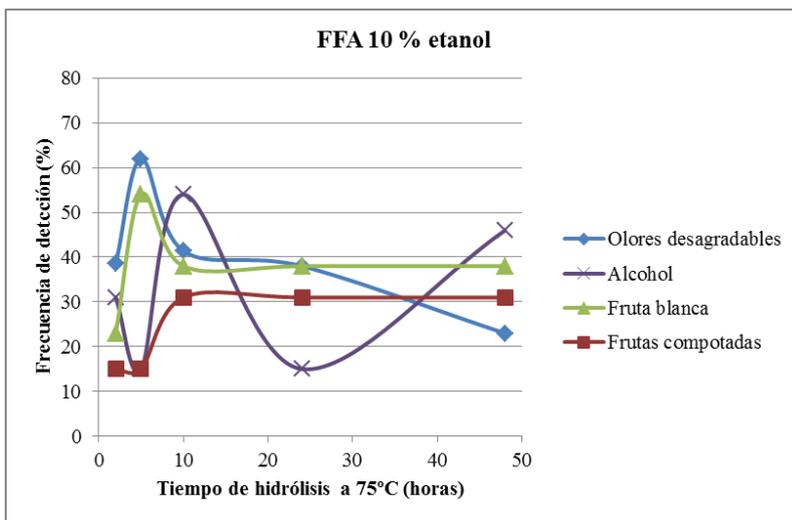
**Figura 25:** Representación de los descriptores de la muestra de FFA 10% etanol tras la hidrólisis a 75°C a los tiempos de 2, 5, 10, 24, 48 horas que muestran una frecuencia acumulada igual o superior al 15%.

En las figuras 26 y 27 se muestra la evolución de los descriptores mayoritarios al aumentar el tiempo de hidrólisis. En la muestra de FFA 2% etanol se observa como al aumentar el tiempo aumentan los olores desagradables y el aroma a frutas compotadas, disminuyendo el aroma de fruta blanca. En la muestra de 10% etanol v/v no se ve claro este efecto debido a la alta concentración de etanol comentada por los catadores. Hay que tener en cuenta además, que a parte de la propia

percepción del etanol, el contenido alcohólico del hidrolizado también influye en la liberación a la fase gas de los compuestos volátiles. Los compuestos más apolares están más fijados en la disolución de 10% de alcohol que en la de 2%, destacando olfativamente más en esta última.



**Figura 26:** Evolución de los compuestos principales del olor de la FFA 2% etanol de la frecuencia de detección frente al tiempo de hidrólisis.



**Figura 27:** Evolución de los compuestos principales del olor de la FFA 10% etanol de la frecuencia de detección frente al tiempo de hidrólisis.

En conclusión, desde el punto de vista sensorial, el tiempo de hidrólisis influye en el perfil de compuestos liberados, con una relación óptima entre olores agradables y desagradables que va a estar alrededor de las 15 h en la FFA hidrolizada con 2% de etanol.

### 5.3. Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría

Aunque la preparación de las muestras se realizó antes del confinamiento estas no se pudieron analizar por GC-O-FID debido a la situación de pandemia por COVID-19. Una vez levantado el estado de alerta, se consideró que la intervención de la nariz humana como detector no era adecuada por el riesgo de contagio que está técnica implicaba. Por tanto, se decidió no realizar el análisis GC-O-FID de las muestras y basar la búsqueda de los odorantes principales exclusivamente en la respuesta de los detectores químicos.

#### 5.4. Análisis de compuestos volátiles. Trazas

Los compuestos más relevantes identificados en las fracciones hidrolizadas fueron estudiados mediante un análisis cuantitativo por GC-MS. La identificación de los compuestos se realizó mediante librerías de espectros de masas e índices de retención lineal (cuando estaban disponibles). Como se puede observar en el anexo V, aldehídos, terpenos, norisoprenoides y sesquiterpenos son las familias químicas con mayor representación en los hidrolizados. Es lógica la ausencia de ésteres en los hidrolizados ya que, como se explicó en la revisión bibliográfica, su producción en la manzana requiere la intervención de diversos sistemas enzimáticos que están desactivados en el proceso de hidrólisis. Por otra parte, compuestos como terpenos, sesquiterpenos y norisoprenoides que pueden almacenarse en forma de precursores glicosídicos sí van a ser revelados durante el proceso de hidrólisis química.

En el anexo V se muestran los valores de las áreas absolutas obtenidos tras la integración de los picos de los compuestos identificados en las muestras analizadas por el cromatógrafo junto con sus condiciones de análisis. En el anexo VI se detallan las áreas relativas de los compuestos identificados a sus correspondientes patrones internos. De esta forma se corregían las posibles variaciones asociadas al análisis cuantitativo. Por limitaciones de tiempo y disponibilidad de patrones, la cuantificación de los compuestos se realizó en términos de áreas relativas que, si bien permitían establecer comparaciones en cuanto a la generación de los diferentes volátiles, no permiten conocer con exactitud la concentración de compuestos generadas. Es posible establecer un factor de conversión semicuantitativo basado en la concentración de los estándares internos de aproximadamente 40  $\mu\text{g/l}$  por cada unidad de área relativa. Sin embargo, dada la naturaleza de comparación de condiciones de este estudio se decidió realizar los análisis estadísticos utilizando áreas relativas por considerarse más exactas.

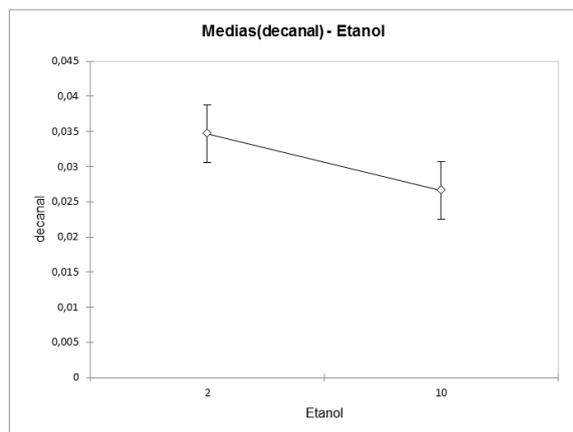
Antes de realizar el análisis de varianza se comprobó que los datos obtenidos seguían una distribución normal, para lo cual se realizó la prueba de normalidad de los residuos de Shapiro-Wilk. ( $H_0$ : Los residuos siguen una distribución Normal.  $H_a$ : Los residuos no siguen una distribución Normal). Como el valor-p calculado de todos los compuestos era mayor que el nivel de significación  $\alpha=0,05$ , no se pudo rechazar la hipótesis nula  $H_0$ , es decir, los residuos seguían una distribución normal. Tras esta comprobación se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores: la concentración de etanol en la muestra (2 niveles: 2 y 10% etanol) y tiempo de hidrólisis a 75°C (5 niveles: 2, 5, 10, 24, 48 horas) con un intervalo de confianza del 95% (también se estudiaron los compuestos con un intervalo de confianza del 90%); siendo la variable dependiente los distintos compuestos.

El test ANOVA es un modelo de correlación que asume que la varianza observada en las muestras se puede explicar con la media de las muestras, la contribución de la concentración de etanol, la contribución del tiempo de hidrólisis y un error  $R^2$  informa de la bondad de ajuste del modelo matemático planteado. En las tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se detalla la bondad del ajuste para cada uno de los compuestos. En el caso del hexanal cuya  $R^2$  es de 0,952 significa que el modelo de varianza de las muestras propuesto explica el 95,2% de la varianza y el 4,8% restante no se explica con el modelo pudiendo ser debido a la interacción concentración de etanol-tiempo de hidrólisis u otros factores que no se han podido tener en cuenta.

Los dos factores estudiados no tuvieron la misma influencia en términos de significatividad. Sólo en uno de los compuestos estudiados el factor de concentración de etanol fue significativo, mientras que en numerosos compuestos el factor tiempo de hidrólisis afectó de forma significativa a la cantidad de compuesto generados en la hidrólisis.

Para saber si las interacciones de concentración de etanol y tiempo de hidrólisis son significativas se deben comparar con el error aleatorio. Este se obtiene a partir de las medidas de las réplicas de las muestras, pero debido al planteamiento inicial del experimento no se realizaron, por ello con los cálculos realizados en el análisis de varianza ANOVA no se puede ver la interacción entre los factores concentración de etanol y tiempo de hidrólisis. Se está asumiendo que son variables independientes y no existe interacción entre ellas. Por otro lado considerando que la extracción se realizó con etanol al 15% y que luego la hidrólisis ácida (rearreglos estructurales de los compuestos) tuvo lugar bajo dos concentraciones de etanol 2 y 10% v/v, el no haber realizado réplicas de las muestras no supone tanto perjuicio puesto que la concentración de etanol no influye tanto en la muestra final. Hubiera influido más si las extracciones se hubieran realizado a dos concentraciones de etanol, puesto que cuanto mayor es la concentración de etanol, más compuestos se extraen de la muestra.

Para estudiar las diferencias significativas entre los dos factores % etanol y tiempo de hidrólisis se realizó el test Fisher LSD (Least Significant Difference). En cuanto a la concentración de etanol 2 y 10% v/v no existieron diferencias significativas entre las medias de los valores de los compuestos a los distintos tiempos de hidrólisis para ningún compuesto excepto para el decanal (figura 28). Respecto al tiempo de hidrólisis existen diferencias significativas en los compuestos cuya  $F < 0,05$  que se detalla en las tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Algunos ejemplos de estos compuestos se encuentran en el anexo VII en donde se pueden observar los grupos de diferencias significativas.



**Figuras 28:** Media de los valores de áreas relativas de los distintos tiempos de hidrólisis agrupados por la concentración de etanol 2 y 10%.

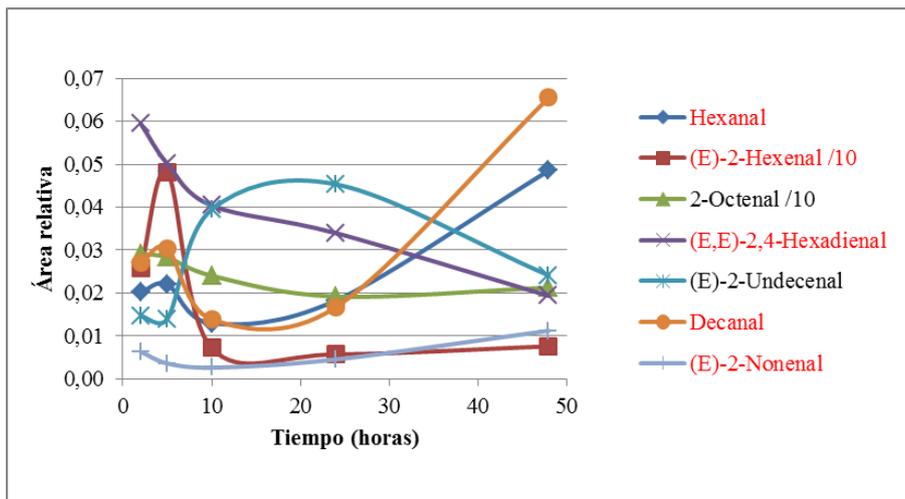
Atendiendo a las consideraciones anteriores, caracterizando los olores y ordenando los compuestos por familias, se observan las siguientes diferencias significativas en la concentración de los compuestos conforme aumenta el tiempo de hidrólisis.

### ➤ Aldehídos

En la tabla 6 se muestra como el hexanal (herbáceo); (E)-2-hexenal (herbáceo); (E,E)-2,4-hexadienal (herbáceo), decanal (floral, cítrico) y (E)-2-nonenal (papel) son compuestos cuya concentración aumenta significativamente ( $p(F) < 0,05$ ) conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, a excepción del (E,E)-2,4-hexadienal ( $p(F) < 0,05$ ) que se descompone con el paso del tiempo (figura 29). Estos compuestos que caracterizan olores herbáceos son derivados de la oxidación de ácido grasos y aportan frescura a los aromas frutales (Ferreira y López, 2019). Hay que recordar que todas las hidrólisis se realizaron en condiciones de anoxia estricta y que por tanto, la generación de estos aldehídos no puede deberse a una reacción con oxígeno libre.

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
<b>Hexanal</b>	0,952	<b>0,009</b>	0,150	<b>0,007</b>
<b>(E)-2-Hexenal</b>	0,988	<b>0,001</b>	0,072	<b>0,000</b>
<b>2-Octenal</b>	0,824	0,113	0,229	0,097
<b>(E,E)-2,4-Hexadienal</b>	0,914	<b>0,029</b>	0,783	<b>0,021</b>
<b>(E)-2-Undecenal</b>	0,833	0,102	0,541	0,077
<b>Decanal</b>	0,988	<b>0,001</b>	<b>0,018</b>	<b>0,000</b>
<b>(E)-2-Nonenal</b>	0,898	<b>0,041</b>	0,236	<b>0,032</b>

**Tabla 6:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de los aldehídos en las muestras de FFA de manzana a 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. En rojo compuestos con un IC ≥ 95%,  $\alpha = 0,05$ .



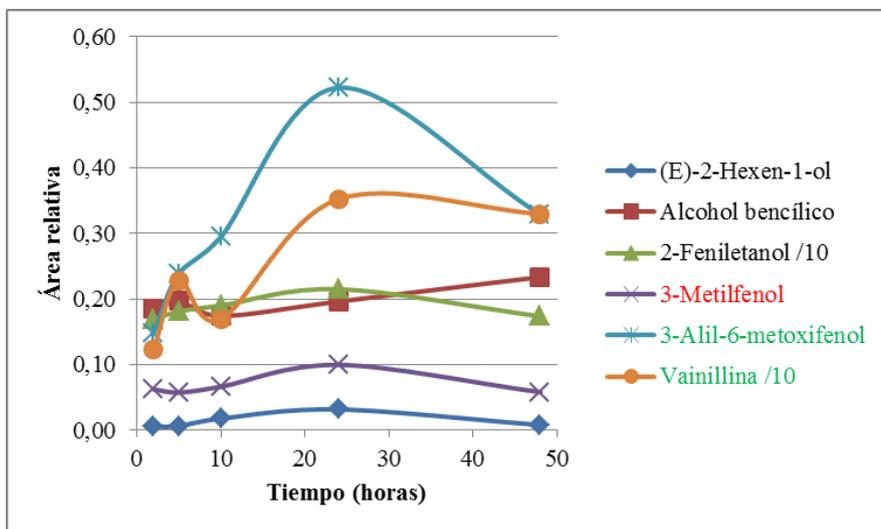
**Figuras 29:** Evolución de los compuestos de la familia de los aldehídos en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

➤ **Alcoholes, fenoles y derivados**

En la tabla 7 se muestra como el 3-metilfenol (medicinal, madera, piel) ( $p(F)<0,05$ ); 3-alil-6-metoxifenol (dulce, floral) y vainillina (dulce, floral) ( $p(F)<0,1$ ) son compuestos cuya concentración aumenta significativamente hasta las 24 horas y a partir de entonces se empiezan a degradar (figura 30).

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
(E)-2-Hexen-1-ol	0,603	0,437	0,750	0,354
Alcohol bencílico	0,759	0,196	0,911	0,147
2-Feniletanol	0,635	0,386	0,474	0,334
<b>3-Metilfenol</b>	0,912	<b>0,031</b>	0,122	<b>0,026</b>
<b>3-Alil-6-metoxifenol</b>	0,861	<b>0,073</b>	0,309	<b>0,058</b>
<b>Vainillina</b>	0,882	<b>0,054</b>	0,844	<b>0,038</b>

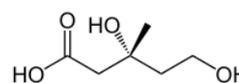
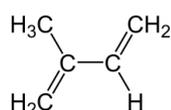
**Tabla 7:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de los alcoholes, fenoles y derivados en las muestras de la FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Compuestos con un IC $\geq$ 95% en rojo y en verde IC $\geq$ 90%.



**Figuras 30:** Evolución de los compuestos de la familia de los alcoholes, fenoles y derivados en las muestras de la FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

### ➤ Terpenos

Son compuestos orgánicos derivados del isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (figura 31). El precursor de los terpenos es el ácido mevalónico (figura 32), el cual proviene del acetil coenzima A. Cuando los terpenos son modificados químicamente, por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse terpenoides (por ejemplo la vitamina A (retinol) se obtiene de la oxidación del caroteno).

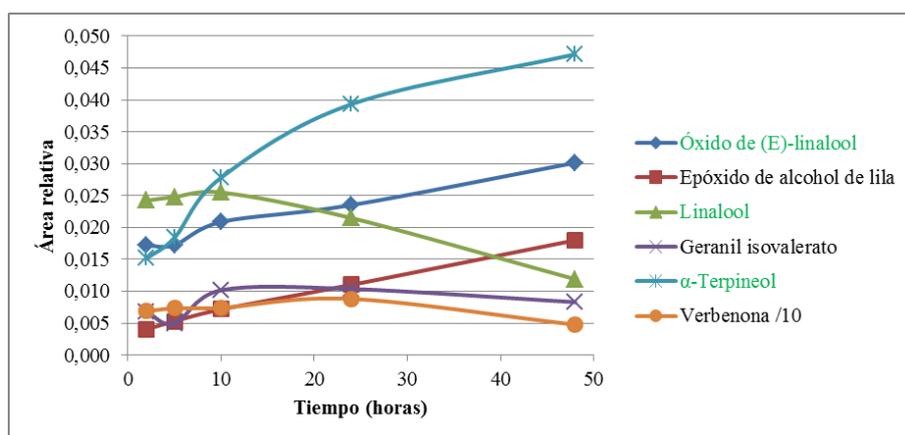


**Figura 31:** Estructura molecular del isopreno. **Figura 32:** Estructura molecular del ácido mevalónico.

En la tabla 8 se puede ver como el óxido de (E)-linalool (floral), linalool (cítrico, floral) y  $\alpha$ -terpineol (floral) presentan cambios significativos. Al aumentar el tiempo de hidrólisis aumenta significativamente ( $p(F)<0,1$ ) la concentración de óxido de (E)-linalool y  $\alpha$ -terpineol, pero sin embargo el linalool se descompone significativamente ( $p(F)<0,1$ ) conforme aumenta el tiempo de hidrólisis (figura 33) debido a su inestabilidad frente al proceso de hidrólisis ácida (Ferreira y López, 2019). Estos cambios, especialmente la disminución del linalool que tiene un bajo valor umbral, podrían estar relacionados con la tendencia a la bajada en la percepción de la fruta blanca y un mayor dominio de las notas de fruta compotada por parte de los catadores.

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
Óxido de(E)-linalool	0,951	0,010	0,329	0,007
Epóxido de alcohol de lila	0,729	0,238	0,368	0,204
Linalool	0,929	0,020	0,686	0,014
Geranil isovalerato	0,624	0,403	0,733	0,324
$\alpha$ -Terpineol	0,984	0,001	0,333	0,001
Verbenona	0,598	0,446	0,332	0,437

**Tabla 8:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de los terpenos en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Compuestos con un IC $\geq$ 95%,  $\alpha=0,05$  en rojo y en verde IC $\geq$ 90%,  $\alpha=0,01$ .



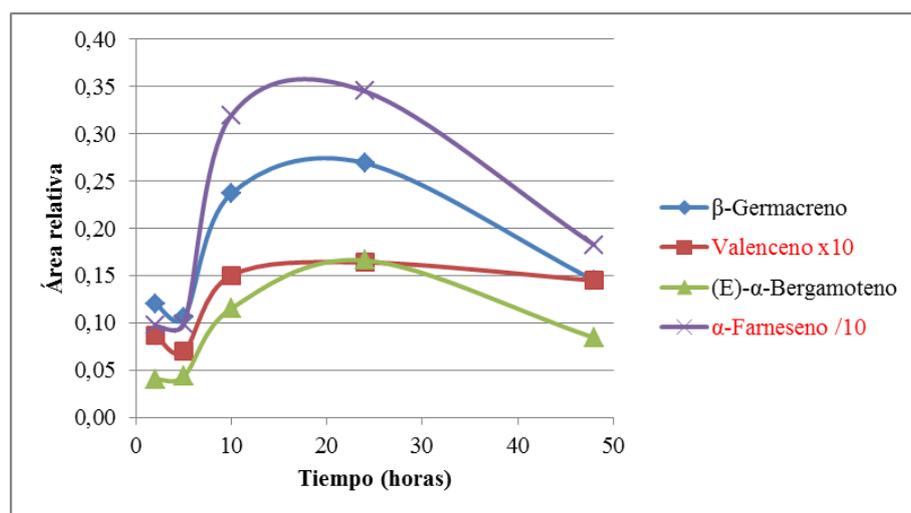
**Figuras 33:** Evolución de los compuestos de la familia de los terpenos en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

### ➤ Sesquiterpenos

Son terpenos de 15 carbonos. En la tabla 9 se puede ver como el valenceno (herbáceo, madera) y  $\alpha$ -farneseno (fruta madura), se observan diferencias significativas ( $p(F)<0,05$ ) de aumento de la concentración al aumentar el tiempo de hidrólisis hasta las 24 horas, pasado este tiempo los compuestos se empiezan a degradar (figura 34). El  $\alpha$ -farneseno, compuesto más dominante de esta categoría, está asociado a la fruta madura (Espino et al., 2016)

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
$\beta$ -Germacreno	0,811	0,128	0,933	0,094
<b>Valenceno</b>	0,953	<b>0,009</b>	0,502	<b>0,006</b>
(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	0,721	0,250	0,557	0,200
<b><math>\alpha</math>-Farneseno</b>	0,975	<b>0,003</b>	0,792	<b>0,002</b>

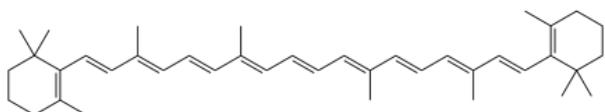
**Tabla 9:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de los sesquiterpenos en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. En rojo compuestos con un  $IC \geq 95\%$ ,  $\alpha=0,05$ .



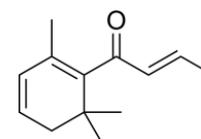
**Figuras 34:** Evolución de los compuestos de la familia de los sesquiterpenos en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

### ➤ Norisoprenoides

Son productos de la degradación enzimática oxidativa de los carotenoides (figura 35), los más relevantes son la  $\beta$ -damascenona (figura 36),  $\beta$ -ionona, 1,1,6-trimetil-1,2,-dihidronaftaleno (TDN) y el vitispirano.



**Figura 35:**  $\beta$ -Caroteno.



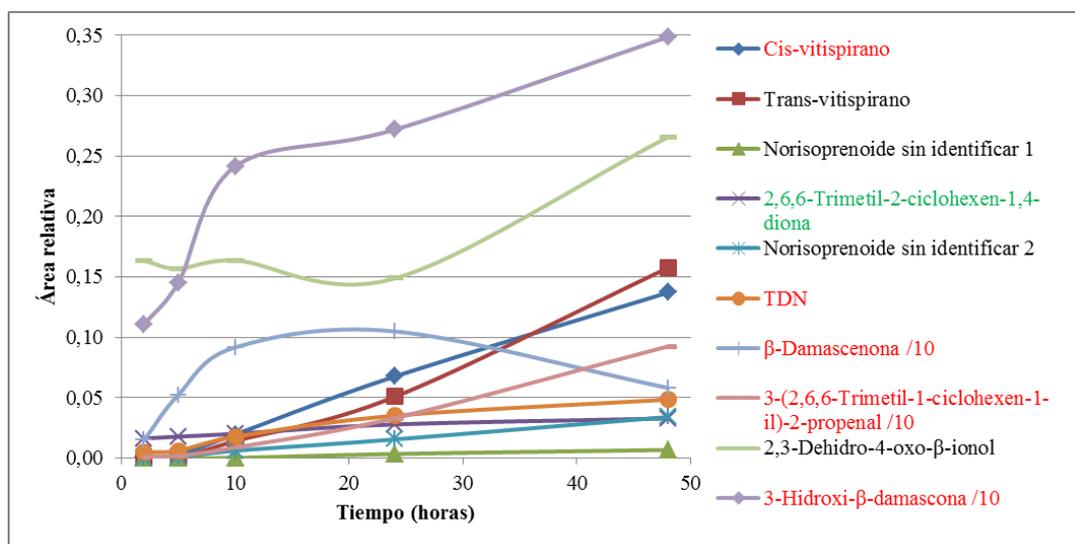
**Figura 36:**  $\beta$ -damascenona.

En la tabla 10 se observa como el cis-vitispirano (floral, frutal), TDN (tabaco, queroseno),  $\beta$ -damascenona (floral), 3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal y 3-hidroxi- $\beta$ -damascona

(floral) ( $p(F)<0,05$ ) y 2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona ( $p(F)<0,1$ ), tienen un aumento significativo de la concentración conforme aumenta el tiempo de hidrólisis (figura 37). Para la formación de  $\beta$ -damascenona, compuesto más relevante en este grupo de olor floral, se requiere una hidrólisis química que produce un rearrreglo estructural de los carotenoides, por diferentes rutas a partir de su precursor y que pueden explicar la existencia de un máximo con el tiempo (Ferreira y López, 2019). También hay que destacar la formación de olores desagradables como el TDN que pueden ganar más relevancia aromática conforme aumenta el tiempo de hidrólisis. Dos de los norisoprenoides no pudieron ser identificados por las librerías, sus espectros de masas se incluyen en el anexo VIII.

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
Cis-vitispirano	0,996	< 0,0001	0,989	< 0,0001
Trans-vitispirano	0,665	0,337	0,426	0,294
Norisoprenoide sin identificar 1	0,823	0,114	0,201	0,102
2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	0,860	0,074	0,643	0,055
Norisoprenoide sin identificar 2	0,578	0,479	0,316	0,486
TDN	0,969	0,004	0,552	0,003
$\beta$ -Damascenona	0,892	0,046	0,190	0,037
3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	0,929	0,021	0,543	0,015
2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	0,337	0,825	0,401	0,872
3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	0,981	0,002	0,152	0,001

**Tabla 10:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de los norisoprenoides en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Compuestos con un  $IC \geq 95\%$ ,  $\alpha=0,05$  en rojo y en verde  $IC \geq 90\%$ ,  $\alpha=0,01$ .



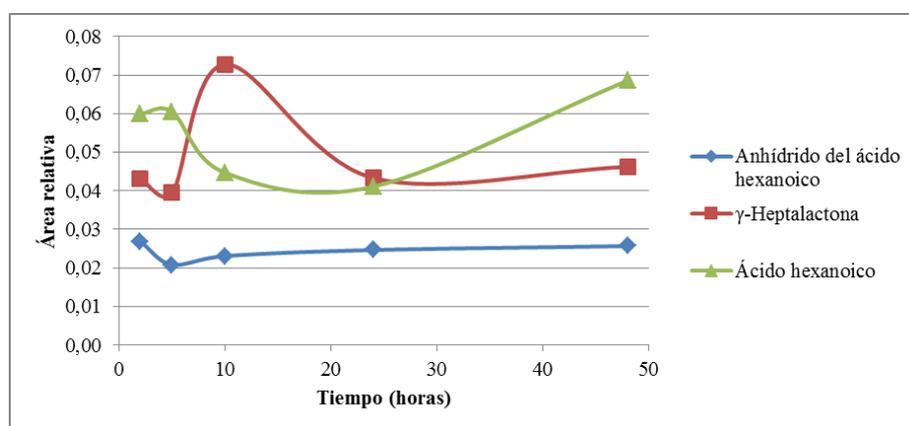
**Figura 37:** Evolución de los compuestos de la familia de los norisoprenoides en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

### ➤ Miscelanea

Como se puede ver en la tabla 11, no se observan diferencias significativas en ningún compuesto de la familia al aumentar el tiempo de hidrólisis (figura 38).

Compuesto	R <sup>2</sup>	Probabilidad Total p(F)	Probabilidad % Etanol	Probabilidad Tiempo hidrólisis
Anhídrido del ácido hexanoico	0,464	0,657	0,640	0,582
γ-Heptalactona	0,458	0,665	0,844	0,567
Ácido hexanoico	0,671	0,328	0,887	0,254

**Tabla 11:** Bondad del ajuste y significatividad de los compuestos de la familia de las misceláneas en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.



**Figuras 38:** Evolución de los compuestos de la familia de las misceláneas en las muestras de FFA de manzana al 2 y 10% etanol al ser envejecidas a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

Respecto a los compuestos generados en la hidrólisis enzimática, observando el anexo VI, compuestos como: óxido de (E)-linalool (floral), 2-feniletanol (fruta, miel, lila, rosa) y 3-alil-6-metoxifenol; se producen en mayor proporción que en la hidrólisis ácida a cualquiera de los tiempos. Otros compuestos relevantes producidos son: (E)-2-hexenal (herbáceo), 2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona (floral) y γ-heptalactona (fruta, nuez, caramelo). Este tratamiento sólo era un experimento preliminar y hay que tener en cuenta que el perfil aromático obtenido es muy dependiente del tipo de enzimas utilizadas.

En resumen, los datos de evolución con el tiempo de hidrólisis muestran que en los hidrolizados con un 2% de etanol existen máximos alrededor de las 24 h de hidrólisis para los compuestos más interesantes desde el punto de vista del aroma potencial (linalool, β-damascenona, vainillina), mientras que compuestos de características olfativas menos agradables como TDN, decanal o (E)-2-nonenal tienden a aumentar a mayores tiempos de hidrólisis.

## 6. Conclusiones

La manzana *Golden Delicious* es la variedad con mayor producción y consumo en España, tanto por su facilidad de cultivo, prolongado almacenamiento en cámara y sus características sensoriales de aroma y sabor. Todo ello hace que esta variedad de manzana acumule gran cantidad de estudios.

El perfil de los compuestos aromáticos en la manzana cambia a lo largo del proceso de maduración, al principio predominan los aldehídos, seguidamente aumenta el contenido de alcoholes y finalmente son los ésteres los que dominan el perfil aromático de la manzana madura. La composición y concentración de compuestos aromáticos volátiles difiere entre variedades, su producción, factores de cosecha y almacenamiento.

La manzana estudiada presentaba un estado de maduración satisfactorio, aunque los valores de firmeza y acidez eran más bajos de los deseados, probablemente por ser una fruta madurada en cámara. Según el panel de catadores la muestra de FFA al 2% etanol v/v era la más adecuada para identificar los odorantes, aumentando su intensidad de olor con el tiempo de hidrólisis llegando su máximo a las 24 horas. A las 10 horas se detecta la máxima proporción de descriptores de fruta blanca (manzana en fresco), seguido de las 24 horas. Los olores desagradables alcanzan el mínimo a las 24 horas, aumentando a partir de entonces. El olor a fruta compotada aumenta con el tiempo de hidrólisis. Esta tendencia de olores se corroborada con el análisis por GC-MS. Los aldehídos, olores herbáceo, floral y cítrico, característicos de fruta menos madura, aumentan significativamente conforme aumenta el tiempo de hidrólisis. En cuanto a los alcoholes, con olores a madera, dulce y floral característicos de la fruta en un estado intermedio de maduración, aumentan su concentración conforme aumenta el tiempo de hidrólisis llegando su máximo a las 24 horas, pasado este tiempo empiezan a degradarse. Los terpenos de olor floral y cítrico, característicos de la fruta en un estado intermedio de maduración, aumentan su concentración conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, excepto el linalool compuesto lábil que empieza a degradarse a partir de las 10 horas. Los sesquiterpenos, con olor a fruta madura, aumentan significativamente hasta las 24 horas y a partir de entonces se empiezan a degradar y finalmente los norisoprenoides como la  $\beta$ -damascenona con olor floral, aumentan su concentración conforme aumenta el tiempo de hidrólisis. En este grupo también se encuentra el TDN cuyo olor a tabaco, queroseno sigue la misma tendencia de aumento.

El trabajo presentado en esta memoria explora por primera vez el potencial aromático contenido en la fracción de precursores de la manzana. Los resultados obtenidos muestran que dicho potencial existe y que puede ser revelado mediante hidrólisis en condiciones de anoxia. Desde el punto de vista tecnológico, este estudio muestra que es posible realizar elaboraciones de bebidas alcohólicas basadas en manzana de formas alternativas a la sidra tradicional, explorando la posibilidad de un mayor tiempo de contacto con la fracción precursora para una mejor revelación del aroma potencial.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Ackermann J, Fischer M, Amado R. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992, n° 40, pp. 1131–1144.
- Altisent R, Graell J, Lara I, López L, Echeverría G. Increased straight-chain esters content after ultra low oxygen storage and its relation to the lipoxygenase system in ‘Golden Reinders®’ apples. *European Food Research and Technology*. 2011, n° 232, pp.51–61.
- Ardö Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*. 2006, n° 24, pp. 238–242.
- Argenta LC, Mattheis JP, Fan X, Finger FL. Production of volatile compounds by Fuji apples following exposure to high CO<sub>2</sub> or low O<sub>2</sub>. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, n° 52, pp. 5957–5963.
- Bai J, Baldwin EA, Goodner KL, Mattheis JP, Brecht JK. Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience*. 2005, n° 40, pp. 1534–1538.
- Baker A, Graham IA, Holdsworth M, Smith SM, Theodoulou F L. Chewing the fat:  $\beta$ -oxidation in signalling and development. *Trends in Plant Science*. 2006, n° 11, pp. 124–132.
- Bartley IM, Hindley SJ. Alcohol dehydrogenase of apple. *The official journal of the Society of Experimental Botany*. 1980, n° 31, pp.449–459.
- Bartley IM, Stoker PG, Martin ADE, Hatfield SGS, Knee M. Synthesis of aroma compounds by apples supplied with alcohols and methyl esters of fatty acids. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1985, n° 36, pp. 567–574.
- Bartley IM. Lipid metabolism of ripening apples. *Phytochemistry*. 1985, n° 24, pp. 2857–2859.
- Brackmann A, Streif J, Bangerth F. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1993, n° 118, pp. 243–247.
- Both V, Brackmann A, Thewes FR, de Freitas Ferreira D, Wagner R. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. *Food Chemistry*. 2014, n° 156, pp. 50–57.
- *Creative enzymes. Rapidase AR 2000* [en línea] [consulta: 24 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www.creative-enzymes.com/product/rapidase-revelation-aroma-ar2000-from-aspergillus-niger\\_3194.html](https://www.creative-enzymes.com/product/rapidase-revelation-aroma-ar2000-from-aspergillus-niger_3194.html)
- Culleré L, San-Juan F, Cacho F. Characterisation of aroma active compounds of Spanish saffron by gas chromatography–olfactometry: Quantitative evaluation of the most relevant aromatic compounds. *Food Chemistry*. 2011, n° 127, pp. 1866–1871.

- Defilippi BG, Dandekar AM, Kader AA. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, nº 52, pp. 5694–5701.
- Defilippi BG, Dandekar AM, Kader AA. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and fresh tissues. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, nº 53, pp. 3133–3141.
- Defilippi BG, Kader AA, Dandekar AM. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*. 2005, nº 168, pp. 1199–1210.
- Defilippi BG, Manríquez D, Luengwilai K, González-Agüero M. Aroma volatiles: biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening. In: Kader JC, Delseny M, editors. *Advances in botanical research*, vol. 50. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V.; 2009. pp. 1–37.
- Delhom MJ. Calidad de manzanas y peras. Hojas divulgadoras nº 6/85 HD. MAPA [en línea] [consulta: 5 de agosto de 2020]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1985\\_06.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1985_06.pdf)
- De Pooter HL, Dirinck PJ, Willaert GA, Schamp NM. Metabolism of propionic acid by Golden Delicious apples. *Phytochemistry*. 1981, nº 20, pp. 2135–2138.
- De Pooter H, Van Acker MR, Schamp NM. Aldehyde metabolism and the aroma quality of stored Golden Delicious apples. *Phytochemistry*. 1986, nº 26, pp. 89–92.
- Diebold R, Schuster J, Däschner K, Binde r S. The branched chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiology*. 2002. pp. 540–550.
- Dimick P S, Hoskin JC, Acree TE. Review of apple flavor—state of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1983, nº 18, pp. 387–409.
- Dixon J, Hewett EW. Exposure to hypoxia conditions alters volatile concentrations of apple cultivars. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, nº 81, pp. 22–29.
- Dickinson JR, Harrison SJ, Hewlins MJE. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, nº 273, pp. 25751–25756.
- Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, Hewlins MJE. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, nº 275, pp. 10937–10942.
- Dickinson JR, Salgado LEJ, Hewlins MJE. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, nº 278, pp. 8028–8034.
- Dunemann F, Ulrich D, Malysheva-Ott o L, Weber W, Longhi S, Velasco R, Costa F. Functional allelic diversity of the apple alcohol acyl-transferase gene MdaAT1 associated with fruit ester volatile contents in apple cultivars. *Molecular Breeding*. 2012, nº 29, pp. 609–625.
- Echeverría G, Fuentes T, Graell J, Lara I, López ML. Aroma volatile compounds of ‘Fuji’ apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*. 2004, nº 32, pp. 29–44.

- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 2004, n° 61, pp. 1401–1426.
- Espino-Díaz M, Sepúlveda DR, González-Aguilar G, Olivas GI. Biochemistry of Apple Aroma: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 2016, n° 54 (4), pp. 375–394. ISSN 1330-9862.
- Fedefruta. *El consumo mundial de manzanas sigue aumentando. 9 julio 2018* [en línea] [consulta: 29 de julio de 2020]. Disponible en: [https://fedefruta.cl/el-consumo-mundial-de-manzanas-sigue-aumentando/#:~:text=En%202016%2C%20China%20fue%20el,%25\)%20e%20Italia%20\(3%25\)](https://fedefruta.cl/el-consumo-mundial-de-manzanas-sigue-aumentando/#:~:text=En%202016%2C%20China%20fue%20el,%25)%20e%20Italia%20(3%25))
- Fellman J, Mattison D, Fan X, Mattheis J. ‘Fuji’ apple storage characteristics in relation to growing conditions and harvest maturity in Washington State. *7th International Controlled Atmosphere Research Conference*, vol. 2; 1997 July 13–18; Davis, CA, USA: University of California. 1997. p. 234.
- Fellman JK, Miller TW, Mattinson DS, Mattheis JP. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*. 2000, n° 35, pp. 1026–1033.
- Fellman JK, Rudell DR, Mattinson DS, Mattheis JP. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of ‘Delicious’ apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, n° 27, pp. 39–51.
- Ferreira V, López R. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. Review. *Biomolecules*. 2019, n° 9, 818.
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science*. 2001, n° 6, pp. 268–273.
- Forney CF, Mattheis JP, Baldwin AE (2009) Effects on flavor. En Yahia EM (Ed) *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. CRC. Boca Ratón, FL, EEUU. pp. 119-159.
- Galliard T. Aspects of lipid metabolism in higher plants. II. The identification and quantitative analysis of lipids from the pulp of pre- and post-climacteric apples. *Phytochemistry*. 1968, n° 7, pp. 1915-1922.
- Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology*. 2001, n° 125, pp. 539–555.
- Gardner HW. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *HortScience*. 1995, n° 30, pp. 197–205.
- Gonda I, Bar E, Portnoy V, Lev S, Burger J, Schaffner AA, et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *Journal of the Society of Experimental Botany*. 2010, n° 61, pp. 1111–1123.
- Hansen K, Poll, L. Conversion of L-isoleucine into 2-methylbut-2-enyl esters in apples. *LWT – Food Science and Technology*. 1993, n° 26, pp. 178–180.
- Harb J, Streif J, Bangerth F. Response of controlled atmosphere (CA) stored ‘Golden Delicious’ apples to the treatments with alcohols and aldehydes as aroma precursors. *Gartenbauwissenschaft*. 2000, n° 65, pp. 154–161.

- Harwood JL. Fatty acid metabolism. An Review. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1988, n° 39, pp. 101–138.
- Heldt HW, Piechulla B. *Plant biochemistry*. San Diego, CA,USA: Elsevier Inc; 2011.
- *InfoAgro*. *El cultivo de la manzana* [en línea] [consulta: 29 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tradicionales/manzana.htm](https://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm)
- Ju Z, Curry EA. Evidence that  $\alpha$ -farnesene biosynthesis during fruit ripening is mediated by ethylene regulated gene expression in apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2000, n° 19, pp. 9–16.
- Kalua CM, Allen MS, Bedgood Jr. DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chemistry*. 2007, n° 100, pp. 273–86.
- Knee M, Hatfield SG. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1981, n° 32, pp. 593–600.
- Kondo S, Setha S, Rudell DR, Buchanan DA, Matt heis JP. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyljasmonate. *Postharvest Biology and Technology*. 2005, n° 36, pp. 61–68.
- Lara I, Graell J, López ML, Echeverría G. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2006, n° 39, pp. 19–28.
- Lara I, Echeverría G, Graell J, López ML. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, n° 55, pp. 6087–6095.
- Lay-Yee M, DellaPenna D, Ross GS. Changes in mRNA and protein during ripening in apple fruit (*Malus domestica* Borkh. cv Golden Delicious). *Plant Physiology*. 1990, n° 94, pp. 850–853.
- Li D, Xu Y, Xu G, Gu L, Li D, Shu H. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (MdAAT2) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*. 2006, n° 67, pp. 658–667.
- López M L, Lavilla MT, Riba M, Vendrell M. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: Golden Delicious and Granny Smith. *Journal of Food Quality*. 1998a, n° 21, pp. 155–166.
- López ML, Lavilla T, Recasens I, Riba M, Vendrell M. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by Starking Delicious apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998b, n° 46, pp. 634–643.
- López Fructuoso ML, Echeverría Cortada G. Apple (*Malus domestica* Borkh). In: Hui YH, editor. *Handbook of fruit and vegetable flavors*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2010. pp. 247–264.
- Lurie S, Pre-Aymard C, Ravid U, Larkov O, Fallik E. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv. Anna apples. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, n° 50, pp. 4251–4256.

- Liu M, Nauta A, Francke C, Siezen RJ. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, nº 74, pp. 4590–4600.
- MAPA. *Fruta de pepita campaña 2018-2019. Boletín 5/2018-19, mes de mayo 2019* [en línea] [consulta: 29 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/190524frutadepepitacampana2018-19may\\_tcm30-510573.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/190524frutadepepitacampana2018-19may_tcm30-510573.pdf)
- MAPA. *Manzana* [en línea] [consulta: 29 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/manzana\\_tcm30-103008.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/manzana_tcm30-103008.pdf)
- MAPA. *Superficies y producciones de cultivos, avance 2019* [en línea] [consulta: 29 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2019-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07\\_9.3.2.pdf](https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2019-Avance/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07_9.3.2.pdf)
- Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, nº 90, pp. 139–159.
- Marin AB, Colonna AE, Kudo K, Kupferman EM, Mattheis JP. Measuring consumer response to ‘Gala’ apples treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Postharvest Biology and Technology*. 2009, nº 51, pp. 73–79.
- Matich A, Rowan D. Pathway analysis of branched-chain ester biosynthesis in apple using deuterium labeling and enantio selective gas chromatography-mass spectrometry. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, nº 55, pp. 2727–2735.
- Mattheis JP, Fellman JK. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 1999, nº 15, pp. 227–232.
- Mattheis JP, Fan X, Argenta LC. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, nº 53, pp. 4510–4516.
- Maya-Meraz IO, Espino-Díaz M, Molina-Corral FJ, González-Aguilar GA, Jacobo-Cuellar JL, Sepulveda DR, Olivás GI. Production of volatiles in fresh-cut apple: effect of applying alginate coatings containing linoleic acid or isoleucine. *Journal of Food Science*. 2014, nº 79, pp. 2185–2191.
- Meigh DF, Hulme AC. Fatty acid metabolism in the apple fruit during the respiration climacteric. *Phytochemistry*. 1965, nº 4, pp. 863–871.
- Meigh DF, Jones JD, Hulme AC. The respiration climacteric in the apple: production of ethylene and fatty acids in fruit attached to and detached from the tree. *Phytochemistry*. 1967, nº 6, pp. 1507–1515.
- Nie LC, Sun JS, Di B. Changes in amino acid and fatty acid contents as well as activity of some related enzymes in apple fruit during aroma production. *Zhi wu sheng li yu fen zi sheng wu xue xue bao*. 2005, nº 31, pp. 663–667.
- Ornelas-Paz JJ, Quintana-Gallegos BM, Escalante-Minakata P, Reyes-Hernández J, Pérez-Martínez JD, Ríos-Velasco C, Ruiz-Cruz S. Relationship between the firmness of Golden Delicious apples and the

- physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening . *Journal of Food Scientists & Technologists*. 2018, n° 55(1), pp. 33-41.
- Paillard NM. Biosynthesis of apple volatiles: formation of alcohols and esters from fatty acids. *Phytochemistry*. 1979, n° 18, pp. 1165–1171.
  - Paillard NM. The flavour of apples, pears and quinces. In: Morton IE, Macleod AJ, editors. *Food Flavours*, Part C. The flavour of fruits. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; 1990. pp. 1–41.
  - Pérez AG, Sanz C. Formation of fruit flavour. In: Brückner B, Wyllie SG, editors. *Fruit and vegetable flavour*. Boca Raton FL, USA: CRC Press; 2008. pp. 71–102.
  - Pechous SW, Whitaker BD. Cloning and functional expression of an (E, E)- $\alpha$ -farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*. 2004, n° 219, pp. 84–94.
  - Porta H, Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*. 2002, n° 130, pp. 15–21.
  - *Pubchem, National Center for Biotechnology Information (USA)* [en línea] [consulta: 11 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
  - Reineccius G. Flavor chemistry and technology. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2006.
  - Rizzolo A, Visai C. Studies on the quality of ‘Golden Delicious’ apples coming from different localities of Trentino. *23rd International Horticultural Congress*. 1990 August 30; Florence, Italy. Wageningen, The Netherlands. ISHS; 1992.
  - Rowan DD, Lane HP, Allen JM, Fielder S, Hunt MB. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, n° 44, pp. 3276–3285.
  - Rowan DD, Allen JM, Fielder S, Hunt MB. Deuterium labeling to study aroma biosynthesis in stored apples. In: Mitchman EJ, editor. *Postharvest Horticulture Series*, vol. 16. Davis, CA, USA: University of California; 1997. pp. 227–233.
  - Rowan DD, Allen JM, Fielder S, Hunt MB. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, n° 47, pp. 2553–2562.
  - Rupasinghe HPV, Paliyath G, Murr DP. Biosynthesis of  $\alpha$ -farnesene and its relation to superficial scald development in ‘Delicious’ apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998, n° 123, pp. 882–886.
  - Saquet AA, Streif J, Bangerth F. Impaired aroma production of CA-stored ‘Jonagold’ apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentrations. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2003, n° 78, pp. 695–705.
  - San-Juan F, Pet’ka J, Cacho J, Ferreira V, Escudero A. Producing headspace extracts for the gas chromatography–olfactometric evaluation of wine aroma. *Food Chemistry*. 2010 Vol 123, pp.188-195.

- Sanz C, Olías JM, Pérez AG. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Tomás Barberán FA, Robins RJ, editors. *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Oxford, UK: Clarendon Press. 1997. pp. 125–255.
- Sanz C, Pérez AG. Plant metabolic pathways and flavor biosynthesis. In: Hui YH, editor. *Handbook of fruit and vegetable flavors*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2010. pp. 129–55.
- Schaffer RJ, Friel EN, Souleyre EJF, Bolitho K, Thodey K, Ledger S et al. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*. 2007, nº 144, pp. 1899–1912.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant Journal*. 2008, nº 54, pp. 712–732.
- Schuster J, Binder S. The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 2005, nº 57, pp. 241–254.
- Smit BA, Engels WJ, Smit G. Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, nº 81, pp. 987–999.
- Streif J, Bangerth F. Production of volatile aroma substances by ‘Golden Delicious’ apple fruits after storage for various times in different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Horticultural Science*. 1988, nº 63, pp. 193–199.
- St-Pierre B, De Luca V. Evolution of acyltransferase genes, origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In: Romeo JT, Ibrahim R, Varin L, De Luca V, editors. Recent advances in phytochemistry, vol. 34: *Evolution of metabolic pathways*. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd; 2000. pp. 285–315.
- Song J, Bangerth F. Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity. *Acta Horticulturae*. 1993, nº 368, pp. 150–159.
- Song J, Bangerth F. The effect of harvest date on aroma compound production from ‘Golden Delicious’ apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*. 1996, nº 8, pp. 259–269.
- Song J, Bangerth F. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, nº 30, pp. 113–121.
- Souleyre EJ, Greenwood DR, Friel EN, Karunairetnam S, Newcomb RD. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS Journal*. 2005, nº 272, pp. 3132–3144.
- Souleyre EJF, Marshall SDG, Oakeshott JG, Russell RJ, Plummer KM, Newcomb RD. Biochemical characterisation of Md-CXE1, a carboxylesterase from apple that is expressed during fruit ripening. *Phytochemistry*. 2011, nº 72, pp. 564–571.

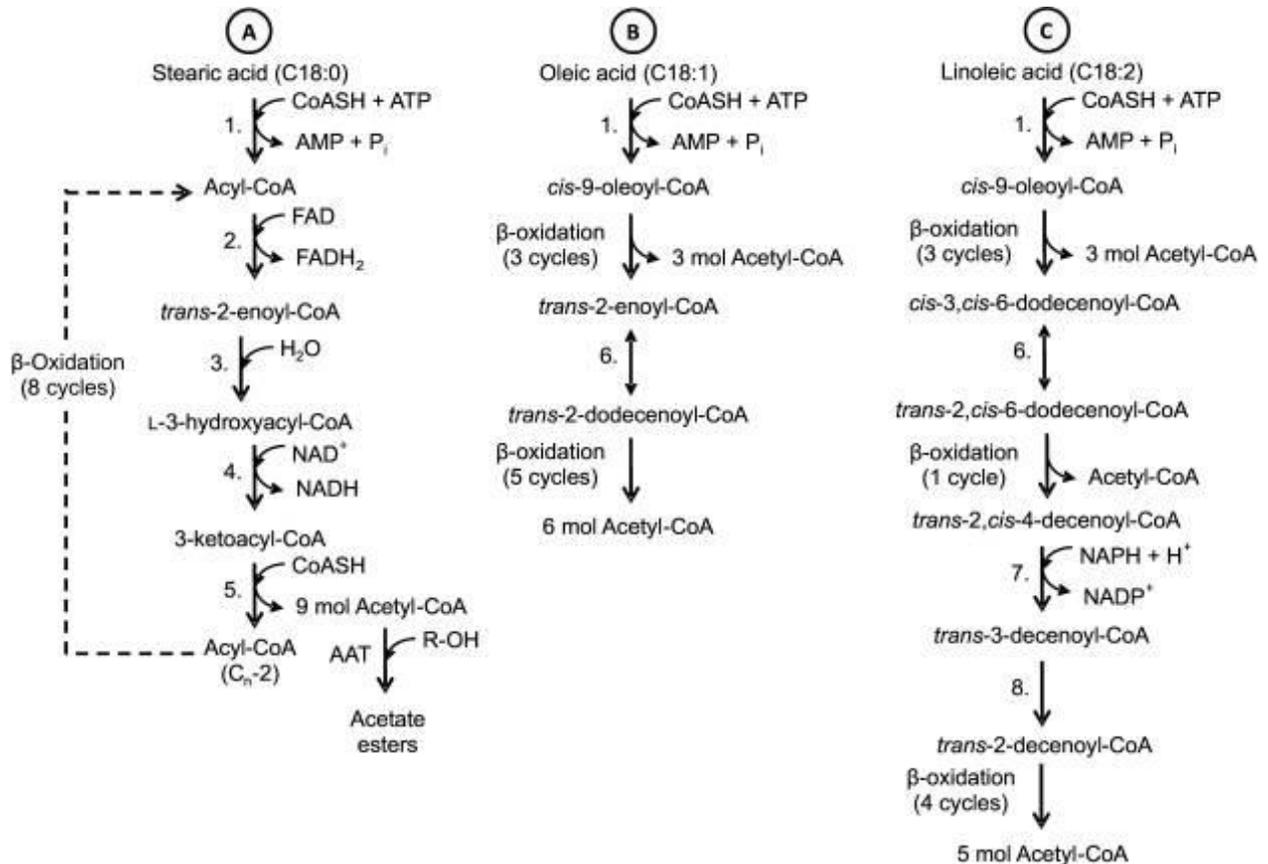
- Sugimoto N, Jones AD, Beaudry R. Changes in free amino acid content in 'Jonagold' apple fruit as related to branched chain ester production, ripening, and senescence. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2011, n° 136, pp. 429–440.
- Twitchy. *Escala Cielab*. 24 de marzo 2020 [en línea] [consulta: 13 de agosto 2020]. Disponible en: <https://twitchytv.live/escala-cielab-11/>
- Tzin V, Galili G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*. 2010, n° 3, pp. 956–972.
- Vallat A, Gu H, Dorn S. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry*. 2005, n° 66, pp. 1540–1550.
- Villatoro C, Altisent R, Echeverría G, Graell J, López ML, Lara I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of 'Pink Lady®' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2008, n° 47, pp. 286–295.
- Yauk YK, Chagné D, Tomes S, Matich AJ, Wang MY, Chen X, et al. The O-methyltransferase gene MdoOMT1 is required for biosynthesis of methylated phenylpropenes in ripe apple fruit. *Plant Journal*. 2015, n° 82, pp. 937–950.
- Young H, Gilbert JM, Murray SH, Ball RD. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1996, n° 71, pp. 329–336.
- Zhang Y, Li P, Cheng L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry*. 2010, n° 123, pp. 1013–1018.

➤ **Normativa y Legislación**

- Reglamento de ejecución (UE) n° 543/2011 de la comisión de 7 de junio de 2011 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo en los sectores de las frutas y hortalizas y de las frutas y hortalizas transformadas.
- UNE-EN ISO 8586:2016 análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento, control de catadores y catadores expertos.
- P-Trazas-Protocolo, Análisis compuestos volátiles minoritarios Trazas. Protocolo. LAAE. Ed.2, 2019.

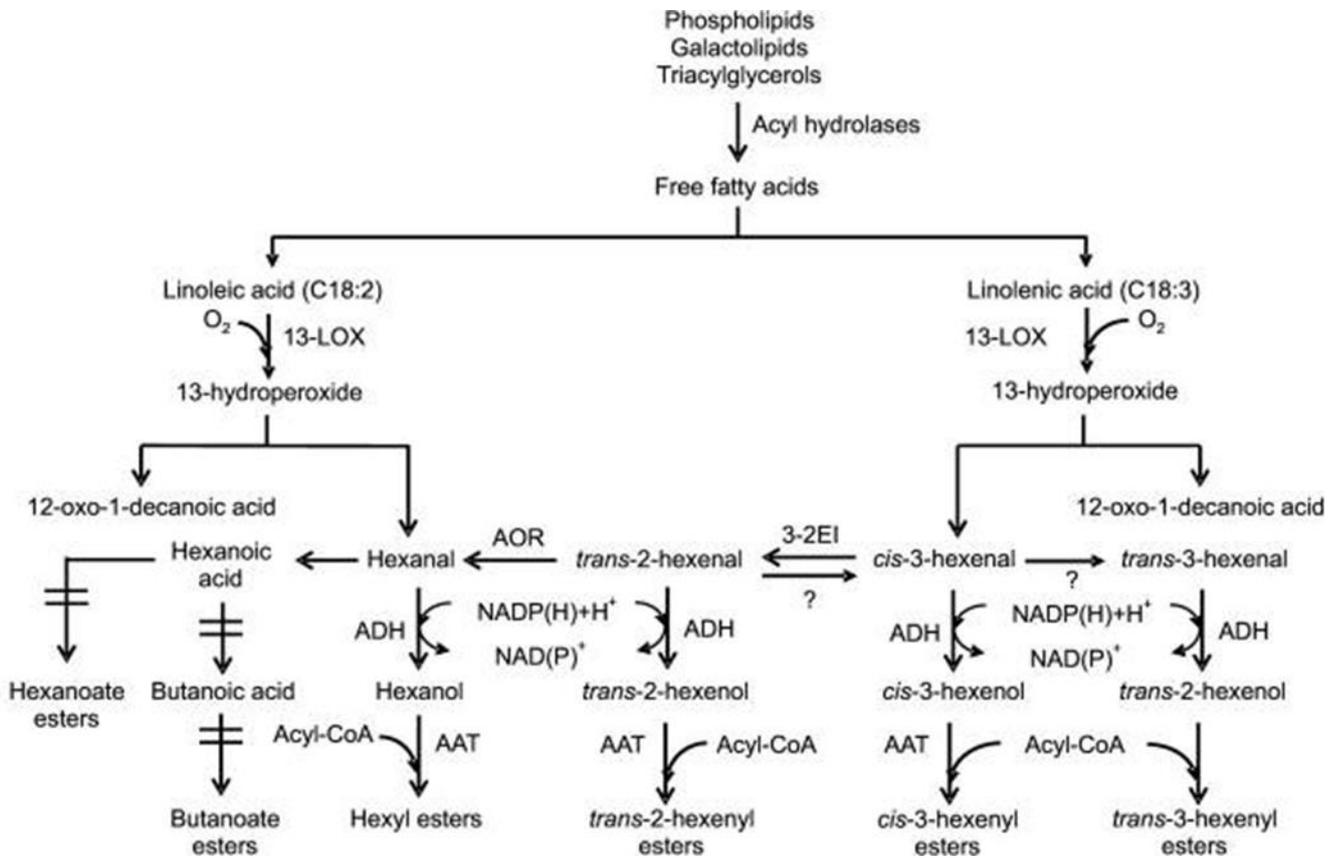
## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I



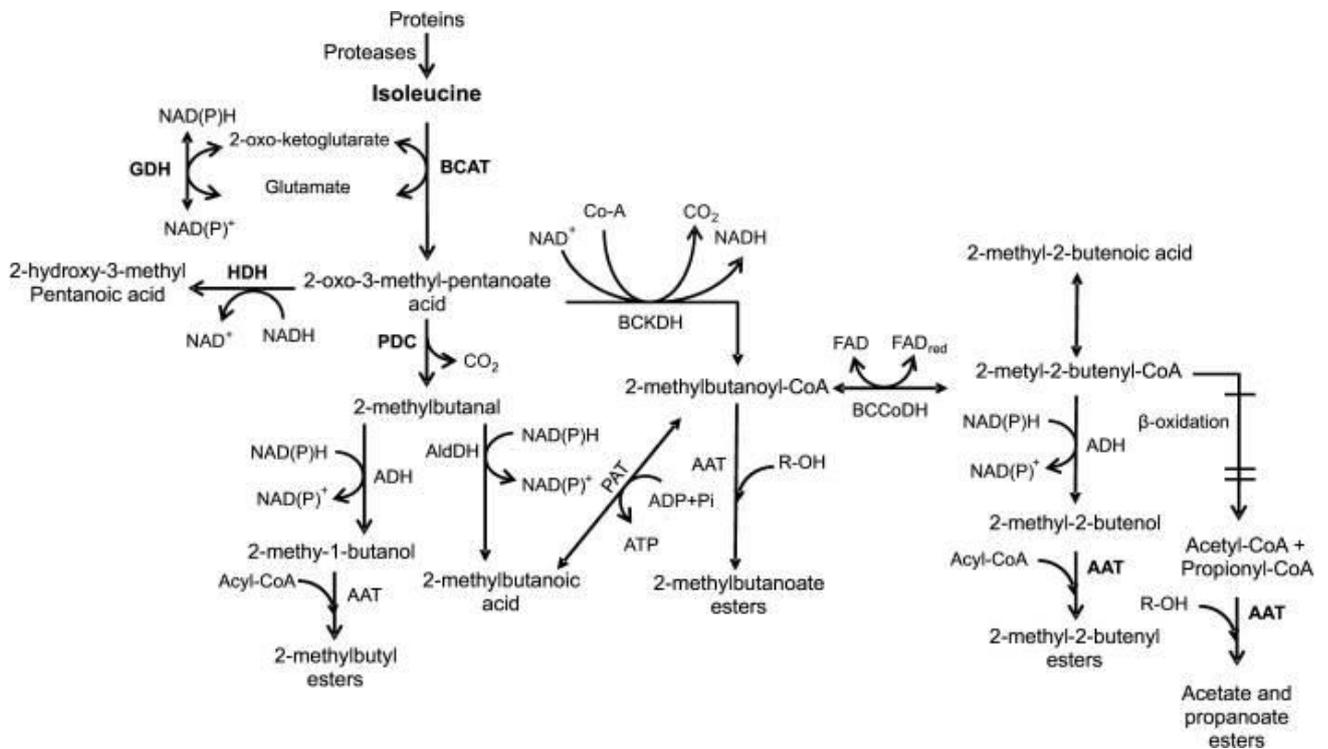
**Anexo I:** Vía de β-oxidación de ácidos grasos C18. A = ácido graso saturado (esteárico), B = ácido graso insaturado con un doble enlace en configuración cis (oleico), C = ácido graso insaturado con dos dobles enlaces en configuración cis (linoleico). 1. acil-CoA sintetasa, 2. acil-CoA oxidasa, 3. trans-2-enoil-CoA hidratasa, 4. 1-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 5. 3-cetotilasa, 6. Δ<sup>3</sup>, Δ<sup>2</sup>- enoil-CoA isomerasa, 7. 2,4-dienoil-CoA reductasa, 8. enoil-CoA isomerasa. (Espino et al. 2016.)

8.2. Anexo II



**Anexo II:** Vía de la lipoxigenasa en la producción de ésteres de acetato a partir del catabolismo de los ácidos linoleico y linolénico. LOX = lipoxigenasa, HPL = hidroperóxido liasa, ADH = alcohol deshidrogenasa, ALDH = aldehído deshidrogenasa, AOR = alquenol oxidoreductasa, 3-2EI = cis-3: trans-2-enal isomerasa, AAT = alcohol aciltransferasa (Espino et al.2016).

## 8.3. Anexo III



**Anexo III:** Metabolismo de aminoácidos. Biosíntesis de compuestos aromáticos volátiles del catabolismo de isoleucina. BCAT = transferasa de aminoácidos de cadena ramificada, GDH = glutamato deshidrogenasa, PDC = piruvato descarboxilasa, BCKD =  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, HDH = ácido 2-hidroxi-3-metil-pentanoico deshidrogenasa, BCCoDH = 2-metil ramificado -acil-CoA deshidrogenasa de cadena, PAT = fosfato acetiltransferasa, AldDH = aldehído deshidrogenasa, ADH = alcohol deshidrogenasa, AAT = alcohol aciltransferasa. (Espino et al. 2016.)

8.4. Anexo IV

PANELISTA:

CÓDIGO MUESTRA:

**Lista de descriptores de aroma**



<input type="checkbox"/> FRUTAL	<input type="checkbox"/> FLORAL	<input type="checkbox"/> ESPECIAS	<input type="checkbox"/> TORREFACTO/MADERA	<input type="checkbox"/> OTROS	
<input type="checkbox"/> FRUTAS BLANCAS <input type="checkbox"/> Manzana <input type="checkbox"/> Membrillo <input type="checkbox"/> Pera  <input type="checkbox"/> FRUTAS AMARILLAS <input type="checkbox"/> Albaricoque/melocotón/nectarina <input type="checkbox"/> Melón  <input type="checkbox"/> CITRICOS <input type="checkbox"/> Limón <input type="checkbox"/> Naranja <input type="checkbox"/> Pomelo  <input type="checkbox"/> FRUTOS ROJOS <input type="checkbox"/> Cereza <input type="checkbox"/> Fresa <input type="checkbox"/> Frambuesa <input type="checkbox"/> Grosella	<input type="checkbox"/> FRUTAS PASAS/COMPOTADAS <input type="checkbox"/> Ciruela <input type="checkbox"/> Dátil <input type="checkbox"/> Higo seco <input type="checkbox"/> Orejón/melocotón seco <input type="checkbox"/> Uva pasa <input type="checkbox"/> Melocotón en almibar <input type="checkbox"/> Guindas en alcohol/Kirsch <input type="checkbox"/> Fruta escarchada <input type="checkbox"/> Fruta escarchada/mermelada  <input type="checkbox"/> FRUTAS TROPICALES <input type="checkbox"/> Coco <input type="checkbox"/> Lichi <input type="checkbox"/> Mango <input type="checkbox"/> Maracuya/fruta de la pasión <input type="checkbox"/> Piña <input type="checkbox"/> Plátano  <input type="checkbox"/> FRUTAS NEGRAS <input type="checkbox"/> Arandano <input type="checkbox"/> Casis/Grosella negra <input type="checkbox"/> Mora	<input type="checkbox"/> Acacia <input type="checkbox"/> Azahar <input type="checkbox"/> Geranio <input type="checkbox"/> Jazmín <input type="checkbox"/> Lila <input type="checkbox"/> Manzanilla <input type="checkbox"/> Miel/Polen <input type="checkbox"/> Rosa <input type="checkbox"/> Tilo <input type="checkbox"/> Violeta  <input type="checkbox"/> VEGETAL <input type="checkbox"/> VERDURAS COCIDAS <input type="checkbox"/> Apio <input type="checkbox"/> Coliflor <input type="checkbox"/> Agua de espárragos <input type="checkbox"/> Agua de olivas <input type="checkbox"/> Alcachofas <input type="checkbox"/> Alubia verde <input type="checkbox"/> Patata cocida  <input type="checkbox"/> VEGETALES FRESCOS <input type="checkbox"/> Hierba/Césped <input type="checkbox"/> Fino/Resina <input type="checkbox"/> Pimiento verde <input type="checkbox"/> Soj <input type="checkbox"/> Hoja de tomatera  <input type="checkbox"/> HIERBAS SECAS <input type="checkbox"/> Tabaco <input type="checkbox"/> Heno/Paja	<input type="checkbox"/> Anís/Regaliz <input type="checkbox"/> Canela <input type="checkbox"/> Clavo <input type="checkbox"/> Curry <input type="checkbox"/> Enebro <input type="checkbox"/> Laurel <input type="checkbox"/> Menta/eucalipto <input type="checkbox"/> Nuez moscada <input type="checkbox"/> Pimienta <input type="checkbox"/> Tomillo <input type="checkbox"/> Vainilla  <input type="checkbox"/> ANIMAL <input type="checkbox"/> Cuero <input type="checkbox"/> Fumé/"Avecrem" <input type="checkbox"/> Almicle <input type="checkbox"/> Pipi de gato <input type="checkbox"/> Pelo mojado <input type="checkbox"/> Transpiración/Sudor	<input type="checkbox"/> TORREFACTO <input type="checkbox"/> Caramelo/Tofe <input type="checkbox"/> Café torrefacto <input type="checkbox"/> Pan tostado  <input type="checkbox"/> MADERA <input type="checkbox"/> Madera nueva <input type="checkbox"/> Madera tostada <input type="checkbox"/> Humo de madera  <input type="checkbox"/> SOTOBOSQUE <input type="checkbox"/> Champiñon <input type="checkbox"/> Humus/Tierra <input type="checkbox"/> Moho <input type="checkbox"/> Humedad/Trapo mojado <input type="checkbox"/> Agua estancada/alcantarilla	<input type="checkbox"/> Alcohol <input type="checkbox"/> Disolvente <input type="checkbox"/> Vinagre <input type="checkbox"/> Alquitrán/Asfalto <input type="checkbox"/> Caucho <input type="checkbox"/> Azufre <input type="checkbox"/> Silex/Pedernal <input type="checkbox"/> Cartón/Polvo <input type="checkbox"/> Chocolate <input type="checkbox"/> Levadura <input type="checkbox"/> Mantequilla/ lácteo <input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Medicinal <input type="checkbox"/> Hidrocarburo

## 8.5. Anexo V

**Anexo V-i:** Áreas de los compuestos en las muestras de la fracción fenólica aromática de la manzana reconstituida al 2 y 10% etanol y envejecida a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

SI	Compuesto	Scan	m/z	2h 2%Et	2h 10%Et	5h 2%Et	5h 10%Et	10h 2%Et	10h 10%Et	24h 2%Et	24h 10%Et	48h 2%Et	48h 10%Et
2-Octanol	Hexanal	1186	82	16975	14075	15926	16424	11093	8365	12016	10107	52251	100226
2-Octanol	(E)-2-Hexenal	2009	55	240136	156717	390226	320722	66547	39829	34731	34285	77986	165469
SI	3-Octanona	2276	99	288689	286325	273419	272488	236628	318639	222184	217136	317257	853610
2-Octanol	2-Octenal	2824	108	253437	193873	231446	187759	177411	191362	102212	130551	215569	473497
2-Octanol	(E,E)-2,4-Hexadienal	3017	95	47723	43609	33207	40255	28428	33891	18304	22920	22122	36663
2-Octanol	(E)-2-Undecenal	3031	57	9967	12557	9437	11036	19109	43972	31097	23768	21551	61325
3,4-DMF	(E)-2-Hexen-1-ol	3309	67	5707	6040	6138	6645	5535	32358	29572	15483	20225	4534
SI	2-Octanol	3422	45	772051	763900	776582	700620	687374	860473	598432	613903	936105	2,433E+06
2-Octanol	Oxido de (E)-linalool	3730	93	14147	12254	13272	12203	16036	15855	13646	14885	28562	72471
2-Octanol	Decanal	3888	81	23952	17642	25906	19034	10930	10221	14798	5328	64171	151862
2-Octanol	Epóxido de alcohol de lila	3966	129	4594	1647	5315	2656	6278	4492	4396	9031	22914	28060
2-Octanol	Cis-vitispirano	4058	192	680	612	2203	1662	13239	16989	37351	44413	132750	321577
2-Octanol	Trans-Vitispirano	4074	177	0	0	0	0	9501	12095	24416	37045	248819	119579
2-Octanol	(E)-2-Nonenal	4111	84	6230	3462	2084	3155	1951	2035	3885	1578	11051	25749
2-Octanol	Linalool	4220	93	20829	16391	19910	16771	16799	22863	12661	13394	10485	30694
2-Octanol	Geranil isovalerato	4254	71	5108	5247	3801	3497	5204	10995	5569	7022	9997	14474
2-Octanol	Norisoprenoide sin id. 1	4381	193	0	0	0	0	0	0	891	3089	3149	23885
2-Octanol	Anhídrido del ácido hexanoico	4399	99	22517	18807	16156	14586	15329	20549	13187	16744	27898	52450
2-Octanol	B-Germacreno	4712	97	87433	97480	72821	82311	135608	238280	194891	130540	131385	364713
2-Octanol	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	5036	96	13288	11427	12877	13074	12615	18638	16188	17422	35703	66224

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

SI	Compuesto	Scan	m/z	2h 2%Et	2h 10%Et	5h 2%Et	5h 10%Et	10h 2%Et	10h 10%Et	24h 2%Et	24h 10%Et	48h 2%Et	48h 10%Et
2-Octanol	$\gamma$ -Heptalactona	5074	85	42035	24240	32146	26367	32343	84779	23950	28618	51581	90991
2-Octanol	$\alpha$ -Terpineol	5110	136	11145	12152	13341	13750	17572	25884	24745	22906	42256	119617
2-Octanol	Verbenona	5136	107	56339	49367	52972	55150	49386	65805	57383	49493	71772	45869
2-Octanol	Valencene	5201	133	7067	6196	5222	5161	9898	13512	8817	11105	14128	33844
2-Octanol	Norisoprenoide sin id. 2	5224	192	0	0	0	921	1678	8174	14805	3671	60077	8775
2-Octanol	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	5264	119	34684	27361	32368	32141	73545	106685	113617	87598	17873	364292
2-Octanol	TDN	5327	157	3034	4155	4243	4595	10778	16666	21745	20639	51555	101248
2-Octanol	$\alpha$ -Farneseno	5392	123	821028	673573	746578	714091	1,961E+06	3,051E+06	2,079E+06	2,104E+06	1,842E+06	4,105E+06
3,4-DMF	$\beta$ -Damascenona	5781	121	187328	132818	585448	490111	793035	1,031E+06	785141	758670	1,235E+06	9,35584E+05
2-Octanol	Ácido hexanoico	5917	73	49247	42880	36564	51721	34505	33695	22230	27654	69103	154201
2-Octanol	Alcohol bencílico	6061	79	155832	128314	151768	138703	115396	155215	107157	130939	222653	557577
3,4-DMF	2-Feniletanol	6250	91	1,789E+06	1,787E+06	1,867E+06	1,845E+06	1,624E+06	2,168E+06	1,554E+06	1,628E+06	2,211E+06	6,277E+06
2-Octanol	3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	6397	163	7979	5561	12070	12840	59816	73543	161258	239011	1,070E+06	1,716E+06
3,4-DMF	2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	6484	83	171338	175394	173229	149396	134933	192810	108087	111822	655039	221313
3,4-DMF	3-Metilfenol	6704	107	76024	57762	59501	58149	50740	82883	58039	92906	74127	208966
3,4-DMF	3-Alil-6-metoxifenol	7500	164	163723	153025	280162	213359	278377	301527	431126	328297	444372	1,128E+06
SI	3,4,-Dimetilfenol	7752	122	1,158E+06	981301	1,096E+06	960814	871590	1,118E+06	662782	832701	1,410E+06	3,296E+06
3,4-DMF	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	9194	208	1,299E+06	1,073E+06	1,516E+06	1,462E+06	1,966E+06	2,879E+06	1,799E+06	2,269E+06	4,465E+06	1,255E+07
2-Octanol	Vainillina	9235	151	1,337E+06	562048	1,419E+06	1,911E+06	967243	1,697E+06	2,139E+06	2,133E+06	3,100E+06	7,987E+06

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

**Anexo V-ii:** Áreas de los compuestos en las muestras de: la fracción fenólica aromática de la de manzana reconstituida al 2% en etanol sometida a hidrólisis enzimática; 2 fracciones fenólicas aromática de la manzana reconstituida al 2% en etanol sin aplicar tratamiento; Control "a" y "b"; blancos sin FFA sometidos a un envejecimiento de 75°C durante 2, 10 y 48 horas.

SI	Compuesto	Scan	m/z	Hidrólisis enzimática	FFA Golden 1	FFA Golden 2	Control "a"	Control "b"	Blanco 2h	Blanco 10h	Blanco 48h
2-Octanol	Hexanal	1186	82	15587	6066	19570	0	0	0	0	0
2-Octanol	(E)-2-Hexenal	2009	55	221713	84001	92479	0	0	0	0	0
SI	3-Octanona	2276	99	198836	275814	295811	239432	300428	295467	262842	320527
2-Octanol	2-Octenal	2824	108	46999	27,551	161573	7990	10155	11015	8823	11059
2-Octanol	(E,E)-2,4-Hexadienal	3017	95	5584	4875	29510	0	0	0	0	0
2-Octanol	(E)-2-Undecenal	3031	57	2232	5828	7905	6486	9543	0	0	0
3,4-DMF	(E)-2-Hexen-1-ol	3309	67	2140	18458	13528	6975	2572	0	0	0
SI	2-Octanol	3422	45	543002	787601	836343	695812	857450	750904	857655	982353
2-Octanol	Oxido de (E)-linalool	3730	93	27155	8010	12028	6449	8421	0	0	0
2-Octanol	Decanal	3888	81	26689	43663	25031	7574	12662	15880	9197	12296
2-Octanol	Epóxido de alcohol de lila	3966	129	0	3331	4281	15644	16404	0	0	0
2-Octanol	Cis-vitispirano	4058	192	6207	29777	389	0	0	0	0	0
2-Octanol	Trans-vitispirano	4074	177	6155	25079	2231	0	0	0	0	0
2-Octanol	(E)-2-Nonenal	4111	84	2650	4642	1894	0	0	1617	2536	2253
2-Octanol	Linalool	4220	93	6358	3952	14258	1,331E+06	1,588E+06	0	0	0
2-Octanol	Geranil isovalerato	4254	71	4941	6149	4874	0	0	4962	5176	3827
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.1	4381	193	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Octanol	Anhídrido del ácido hexanoico	4399	99	6583	16631	15688	36402	42287	1298	1165	1058
2-Octanol	$\beta$ -Germacreno	4712	97	45057	57572	64063	37459	63111	44329	40801	50350
2-Octanol	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	5036	96	43441	7233	16803	0	0	0	0	0
2-Octanol	$\gamma$ -Heptalactona	5074	85	70381	42106	30219	3744	7132	5793	5183	10337

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

SI	Compuesto	Scan	m/z	Hidrólisis enzimática	FFA Golden 1	FFA Golden 2	Control "a"	Control "b"	Blanco 2h	Blanco 10h	Blanco 48h
2-Octanol	$\alpha$ -Terpineol	5110	136	15587	6066	19570	0	0	0	0	0
2-Octanol	Verbenona	5136	107	12504	20206	56309	216208	267073	1818	3432	3021
2-Octanol	Valenceno	5201	133	0	2357	5764	0	0	0	0	0
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.2	5224	192	0	898	0	723	854	0	0	0
2-Octanol	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	5264	119	0	31077	28727	0	0	0	0	0
2-Octanol	TDN	5327	157	2593	14186	3371	639	0	0	0	0
2-Octanol	$\alpha$ -Farneseno	5392	123	5994	248777	710936	2078	2581	0	0	0
3,4-DMF	$\beta$ -Damascenona	5781	121	4587	314738	78893	1,214E+06	1,548E+06	0	0	0
2-Octanol	Ácido hexanoico	5917	73	47577	18267	25610	16001	16508	23130	9670	10998
2-Octanol	Alcohol bencílico	6061	79	412523	52936	171417	7,668E+06	7,619+6	16156	18000	22913
3,4-DMF	2-Feniletanol	6250	91	3,247E+06	698701	1,918E+06	3,011E+07	2,955E+07	199858	565056	824223
2-Octanol	3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	6397	163	17783	155231	3673	0	0	0	0	0
3,4-DMF	2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	6484	83	28876	49787	188336	181266	252497	11628	144270	203892
3,4-DMF	3-Metilfenol	6704	107	5199	17558	62521	123007	157814	0	0	0
3,4-DMF	3-Alil-6-metoxifenol	7500	164	1,494E+06	216781	160091	1,075E+06	1,486E+06	10951	0	1761
SI	3,4,-Dimetilfenol	7752	122	744773	821409	1,140E+06	699941	1,005E+06	776253	816525	1,057E+06
3,4-DMF	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	9194	208	90647	941741	822615	0	0	0	0	0
2-Octanol	Vainillina	9235	151	739926	1,396E+06	2,358E+06	1,203E+07	1,83E+07	0	0	0

## 8.6. Anexo VI

**Anexo VI-i:** Áreas de los compuestos corregidas con el estándar interno en las muestras de la fracción fenólica aromática de la manzana reconstituida al 2 y 10% etanol y envejecida a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas.

SI	Compuesto	Scan	m/z	2h 2%Et	2h 10%Et	5h 2%Et	5h 10%Et	10h 2%Et	10h 10%Et	24h 2%Et	24h 10%Et	48h 2%Et	48h 10%Et
2-Octanol	Hexanal	1186	82	2,199E-02	1,843E-02	2,051E-02	2,344E-02	1,614E-02	9,721E-03	2,008E-02	1,646E-02	5,582E-02	4,119E-02
2-Octanol	(E)-2-Hexenal	2009	55	3,110E-01	2,052E-01	5,025E-01	4,578E-01	9,681E-02	4,629E-02	5,804E-02	5,585E-02	8,331E-02	6,801E-02
SI	3-Octanona	2276	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Octanol	2-Octenal	2824	108	3,283E-01	2,538E-01	2,980E-01	2,680E-01	2,581E-01	2,224E-01	1,708E-01	2,127E-01	2,303E-01	1,946E-01
2-Octanol	(E,E)-2,4-Hexadienal	3017	95	6,181E-02	5,709E-02	4,276E-02	5,746E-02	4,136E-02	3,939E-02	3,059E-02	3,733E-02	2,363E-02	1,507E-02
2-Octanol	(E)-2-Undecenal	3031	57	1,291E-02	1,644E-02	1,215E-02	1,575E-02	2,780E-02	5,110E-02	5,196E-02	3,872E-02	2,302E-02	2,521E-02
3,4-DMF	(E)-2-Hexen-1-ol	3309	67	4,928E-03	6,155E-03	5,600E-03	6,916E-03	6,350E-03	2,894E-02	4,462E-02	1,859E-02	1,434E-02	1,376E-03
SI	2-Octanol	3422	45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Octanol	Oxido de (E)-linalool	3730	93	1,832E-02	1,604E-02	1,709E-02	1,742E-02	2,333E-02	1,843E-02	2,280E-02	2,425E-02	3,051E-02	2,979E-02
2-Octanol	Decanal	3888	81	3,102E-02	2,309E-02	3,336E-02	2,717E-02	1,590E-02	1,188E-02	2,473E-02	8,679E-03	6,855E-02	6,242E-02
2-Octanol	Epóxido de alcohol de lila	3966	129	5,950E-03	2,156E-03	6,844E-03	3,791E-03	9,133E-03	5,220E-03	7,346E-03	1,471E-02	2,448E-02	1,153E-02
2-Octanol	Cis-vitispirano	4058	192	8,808E-04	8,012E-04	2,837E-03	2,372E-03	1,926E-02	1,974E-02	6,241E-02	7,235E-02	1,418E-01	1,322E-01
2-Octanol	Trans-vitispirano	4074	177	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	1,382E-02	1,406E-02	4,080E-02	6,034E-02	2,658E-01	4,915E-02
2-Octanol	(E)-2-Nonenal	4111	84	8,069E-03	4,532E-03	2,684E-03	4,503E-03	2,838E-03	2,365E-03	6,492E-03	2,570E-03	1,181E-02	1,058E-02
2-Octanol	Linalool	4220	93	2,698E-02	2,146E-02	2,564E-02	2,394E-02	2,444E-02	2,657E-02	2,116E-02	2,182E-02	1,120E-02	1,262E-02
2-Octanol	Geranil isovalerato	4254	71	6,616E-03	6,869E-03	4,895E-03	4,991E-03	7,571E-03	1,278E-02	9,306E-03	1,144E-02	1,068E-02	5,949E-03
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.1	4381	193	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	1,489E-03	5,032E-03	3,364E-03	9,817E-03
2-Octanol	Anhídrido del ácido hexanoico	4399	99	2,917E-02	2,462E-02	2,080E-02	2,082E-02	2,230E-02	2,388E-02	2,204E-02	2,727E-02	2,980E-02	2,156E-02
2-Octanol	β-Germacreno	4712	97	1,132E-01	1,276E-01	9,377E-02	1,175E-01	1,973E-01	2,769E-01	3,257E-01	2,126E-01	1,404E-01	1,499E-01
2-Octanol	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	5036	96	1,721E-02	1,496E-02	1,658E-02	1,866E-02	1,835E-02	2,166E-02	2,705E-02	2,838E-02	3,814E-02	2,722E-02

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

SI	Compuesto	Scan	m/z	2h 2%Et	2h 10%Et	5h 2%Et	5h 10%Et	10h 2%Et	10h 10%Et	24h 2%Et	24h 10%Et	48h 2%Et	48h 10%Et
2-Octanol	$\gamma$ -Heptalactona	5074	85	5,445E-02	3,173E-02	4,139E-02	3,763E-02	4,705E-02	9,853E-02	4,002E-02	4,662E-02	5,510E-02	3,740E-02
2-Octanol	$\alpha$ -Terpineol	5110	136	1,444E-02	1,591E-02	1,718E-02	1,963E-02	2,556E-02	3,008E-02	4,135E-02	3,731E-02	4,514E-02	4,916E-02
2-Octanol	Verbenona	5136	107	7,648E-02	9,589E-02	8,062E-02	7,667E-02	1,885E-02	7,648E-02	9,589E-02	8,062E-02	7,667E-02	1,885E-02
2-Octanol	Valenceno	5201	133	1,570E-02	1,473E-02	1,809E-02	1,509E-02	1,391E-02	1,570E-02	1,473E-02	1,809E-02	1,509E-02	1,391E-02
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.2	5224	192	9,499E-03	2,474E-02	5,980E-03	6,418E-02	3,607E-03	9,499E-03	2,474E-02	5,980E-03	6,418E-02	3,607E-03
2-Octanol	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	5264	119	1,240E-01	1,899E-01	1,427E-01	1,909E-02	1,497E-01	1,240E-01	1,899E-01	1,427E-01	1,909E-02	1,497E-01
2-Octanol	TDN	5327	157	1,937E-02	3,634E-02	3,362E-02	5,507E-02	4,161E-02	1,937E-02	3,634E-02	3,362E-02	5,507E-02	4,161E-02
2-Octanol	$\alpha$ -Farneseno	5392	123	3,546E+00	3,474E+00	3,427E+00	1,968E+00	1,687E+00	3,546E+00	3,474E+00	3,427E+00	1,968E+00	1,687E+00
3,4-DMF	$\beta$ -Damascenona	5781	121	9,222E-01	1,185E+00	9,111E-01	8,759E-01	2,839E-01	9,222E-01	1,185E+00	9,111E-01	8,759E-01	2,839E-01
2-Octanol	Ácido hexanoico	5917	73	3,916E-02	3,715E-02	4,505E-02	7,382E-02	6,338E-02	3,916E-02	3,715E-02	4,505E-02	7,382E-02	6,338E-02
2-Octanol	Alcohol bencílico	6061	79	1,804E-01	1,791E-01	2,133E-01	2,379E-01	2,292E-01	1,804E-01	1,791E-01	2,133E-01	2,379E-01	2,292E-01
3,4-DMF	2-Feniletanol	6250	91	1,939E+00	2,345E+00	1,955E+00	1,568E+00	1,904E+00	1,939E+00	2,345E+00	1,955E+00	1,568E+00	1,904E+00
2-Octanol	3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	6397	163	8,547E-02	2,695E-01	3,893E-01	1,143E+00	7,053E-01	8,547E-02	2,695E-01	3,893E-01	1,143E+00	7,053E-01
3,4-DMF	2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	6484	83	1,725E-01	1,631E-01	1,343E-01	4,646E-01	6,715E-02	1,725E-01	1,631E-01	1,343E-01	4,646E-01	6,715E-02
3,4-DMF	3-Metilfenol	6704	107	7,414E-02	8,757E-02	1,116E-01	5,257E-02	6,340E-02	7,414E-02	8,757E-02	1,116E-01	5,257E-02	6,340E-02
3,4-DMF	3-Alil-6-metoxifenol	7500	164	2,697E-01	6,505E-01	3,943E-01	3,152E-01	3,422E-01	2,697E-01	6,505E-01	3,943E-01	3,152E-01	3,422E-01
SI	3,4,-Dimetilfenol	7752	122	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3,4-DMF	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	9194	208	2,575E+00	2,714E+00	2,725E+00	3,167E+00	3,808E+00	2,575E+00	2,714E+00	2,725E+00	3,167E+00	3,808E+00
2-Octanol	Vainillina	9235	151	1,972E+00	3,574E+00	3,474E+00	3,312E+00	3,283E+00	1,972E+00	3,574E+00	3,474E+00	3,312E+00	3,283E+00

Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

**Anexo VI-ii:** Áreas de los compuestos corregidas en las muestras de: la fracción fenólica aromática de la de manzana reconstituida al 2% en etanol sometida a hidrólisis enzimática; 2 fracciones fenólicas aromática de la manzana reconstituida al 2% en etanol sin aplicar tratamiento; Control "a" y "b"; blancos sin FFA sometidos a un envejecimiento de 75°C durante 2, 10 y 48 horas.

SI	Compuesto	Scan	m/z	Hidrólisis enzimática	FFA Golden 1	FFA Golden 2	Control "a"	Control "b"	Blanco 2h	Blanco 10h	Blanco 48h
2-Octanol	Hexanal	1186	82	2,871E-02	7,702E-03	2,340E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	(E)-2-Hexenal	2009	55	4,083E-01	1,067E-01	1,106E-01	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
SI	3-Octanona	2276	99	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Octanol	2-Octenal	2824	108	8,655E-02	3,498E-05	1,932E-01	1,148E-02	1,184E-02	1,467E-02	1,029E-02	1,126E-02
2-Octanol	(E,E)-2,4-Hexadienal	3017	95	1,028E-02	6,190E-03	3,528E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	(E)-2-Undecenal	3031	57	4,110E-03	7,400E-03	9,452E-03	9,321E-03	1,113E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
3,4-DMF	(E)-2-Hexen-1-ol	3309	67	2,873E-03	2,247E-02	1,187E-02	9,965E-03	2,559E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
SI	2-Octanol	3422	45	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Octanol	Oxido de (E)-linalool	3730	93	5,001E-02	1,017E-02	1,438E-02	9,268E-03	9,821E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Decanal	3888	81	4,915E-02	5,544E-02	2,993E-02	1,089E-02	1,477E-02	2,115E-02	1,072E-02	1,252E-02
2-Octanol	Epóxido de alcohol de lila	3966	129	0,000E+00	4,229E-03	5,119E-03	2,248E-02	1,913E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Cis-vitispirano	4058	192	1,143E-02	3,781E-02	4,651E-04	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Trans-vitispirano	4074	177	1,134E-02	3,184E-02	2,668E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	(E)-2-Nonenal	4111	84	4,880E-03	5,894E-03	2,265E-03	0,000E+00	0,000E+00	2,153E-03	2,957E-03	2,293E-03
2-Octanol	Linalool	4220	93	1,171E-02	5,018E-03	1,705E-02	1,913E+00	1,852E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Geranil isovalerato	4254	71	9,099E-03	7,807E-03	5,828E-03	0,000E+00	0,000E+00	6,608E-03	6,035E-03	3,896E-03
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.1	4381	193	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Anhídrido del ácido hexanoico	4399	99	1,212E-02	2,112E-02	1,876E-02	5,232E-02	4,932E-02	1,729E-03	1,358E-03	1,077E-03
2-Octanol	$\beta$ -Germacreno	4712	97	8,298E-02	7,310E-02	7,660E-02	5,383E-02	7,360E-02	5,903E-02	4,757E-02	5,125E-02
2-Octanol	2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona	5036	96	8,000E-02	9,184E-03	2,009E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	$\gamma$ -Heptalactona	5074	85	1,296E-01	5,346E-02	3,613E-02	5,381E-03	8,318E-03	7,715E-03	6,043E-03	1,052E-02

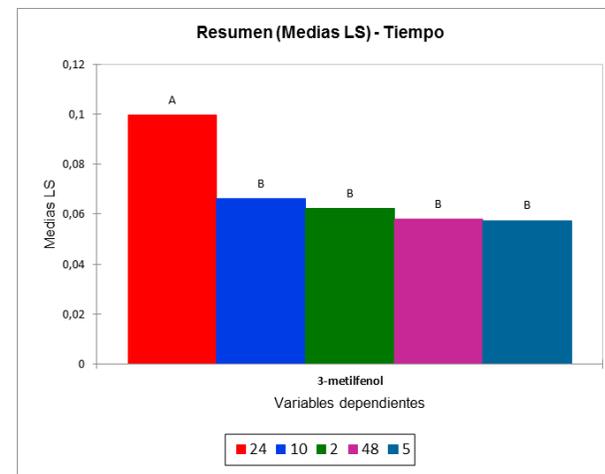
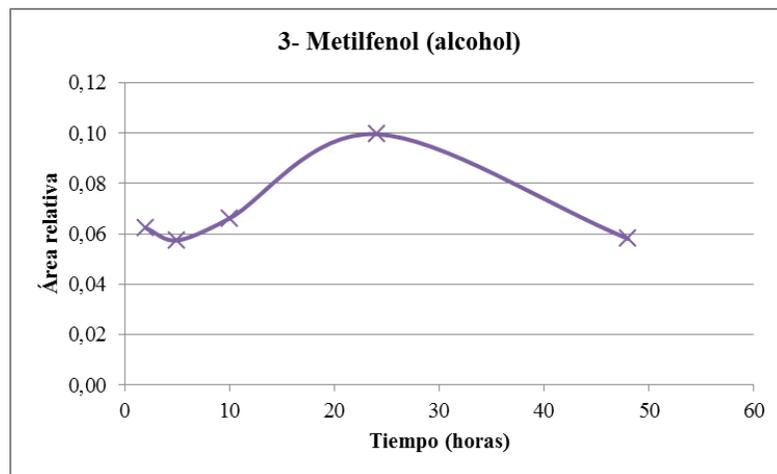
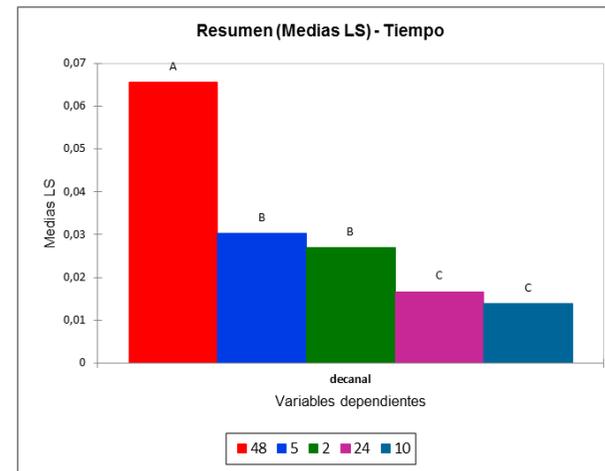
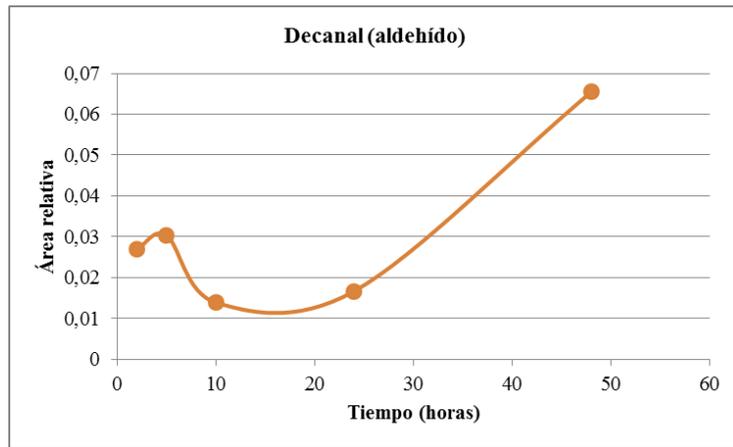
Investigación sobre la Potencialidad Aromática de las Manzanas

Trabajo Fin de Máster

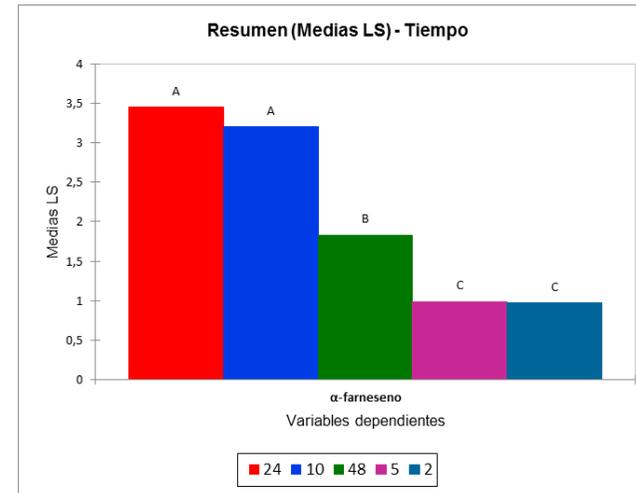
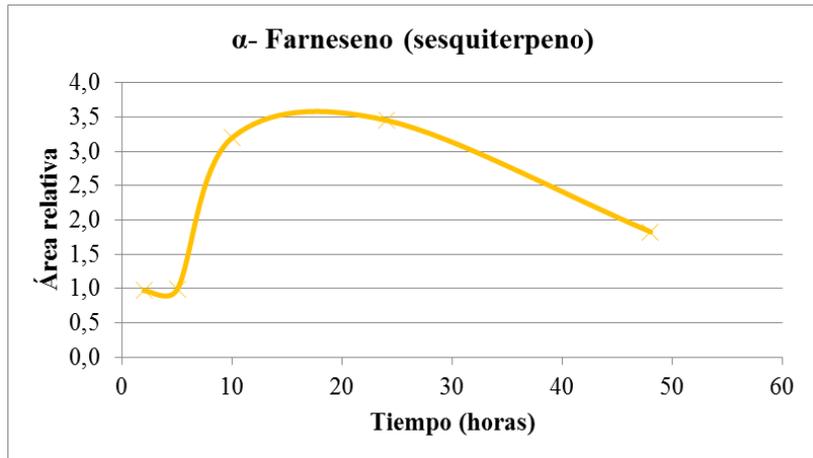
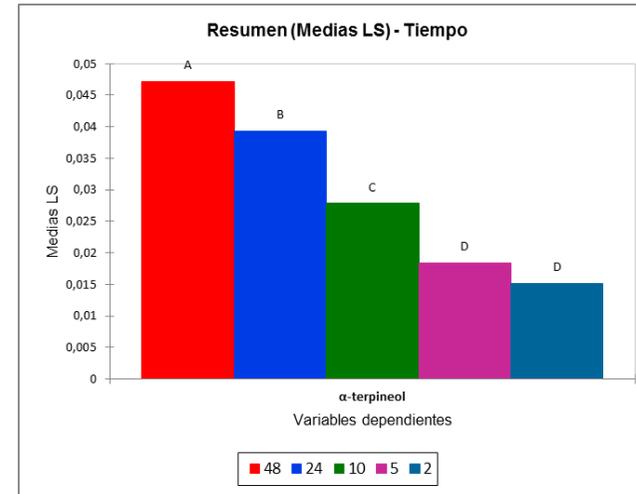
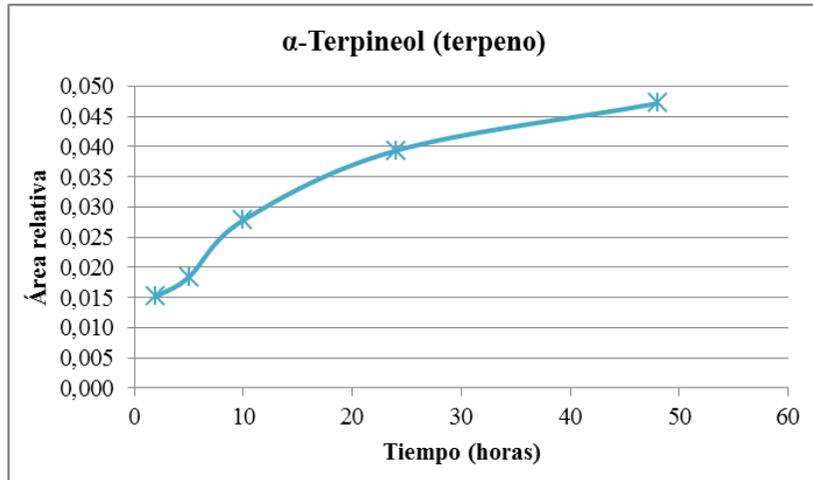
SI	Compuesto	Scan	m/z	Hidrólisis enzimática	FFA Golden 1	FFA Golden 2	Control "a"	Control "b"	Blanco 2h	Blanco 10h	Blanco 48h
2-Octanol	$\alpha$ -Terpineol	5110	136	1,190E-02	1,278E-02	1,260E-02	1,730E+00	1,759E+00	0,000E+00	8,500E-04	7,920E-04
2-Octanol	Verbenona	5136	107	2,303E-02	2,566E-02	6,733E-02	3,107E-01	3,115E-01	2,421E-03	4,002E-03	3,075E-03
2-Octanol	Valenceno	5201	133	0,000E+00	2,993E-03	6,892E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Norisoprenoide sin id.2	5224	192	0,000E+00	1,140E-03	0,000E+00	1,039E-03	9,960E-04	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	5264	119	0,000E+00	3,946E-02	3,435E-02	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	TDN	5327	157	4,775E-03	1,801E-02	4,031E-03	9,184E-04	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	$\alpha$ -Farneseno	5392	123	1,104E-02	3,159E-01	8,501E-01	2,986E-03	3,010E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
3,4-DMF	$\beta$ -Damascenona	5781	121	6,159E-03	3,832E-01	6,920E-02	1,734E+00	1,540E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Ácido hexanoico	5917	73	8,762E-02	2,319E-02	3,062E-02	2,300E-02	1,925E-02	3,080E-02	1,127E-02	1,120E-02
2-Octanol	Alcohol bencílico	6061	79	7,597E-01	6,721E-02	2,050E-01	1,102E+01	#¡VALOR!	2,152E-02	2,099E-02	2,332E-02
3,4-DMF	2-Feniletanol	6250	91	4,360E+00	8,506E-01	1,682E+00	4,302E+01	2,940E+01	2,575E-01	6,920E-01	7,798E-01
2-Octanol	3-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	6397	163	3,275E-02	1,971E-01	4,392E-03	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
3,4-DMF	2,3-Dehidro-4-oxo- $\beta$ -ionol	6484	83	3,877E-02	6,061E-02	1,652E-01	2,590E-01	2,512E-01	1,498E-02	1,767E-01	1,929E-01
3,4-DMF	3-Metilfenol	6704	107	6,981E-03	2,138E-02	5,484E-02	1,757E-01	1,570E-01	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
3,4-DMF	3-Alil-6-metoxifenol	7500	164	2,006E+00	2,639E-01	1,404E-01	1,536E+00	1,479E+00	1,411E-02	0,000E+00	1,666E-03
SI	3,4,-Dimetilfenol	7752	122	1	1	1	1	1	1	1	1
3,4-DMF	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	9194	208	1,217E-01	1,146E+00	7,216E-01	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
2-Octanol	Vainillina	9235	151	1,363E+00	1,772E+00	2,819E+00	1,729E+01	2,130E+01	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00

8.7. Anexo VII

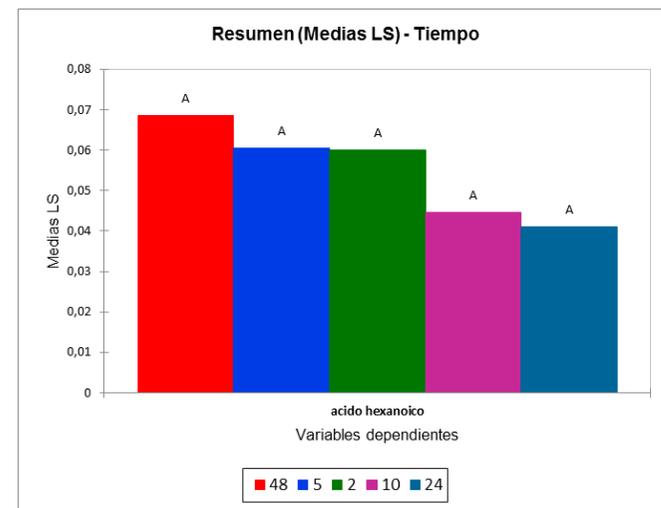
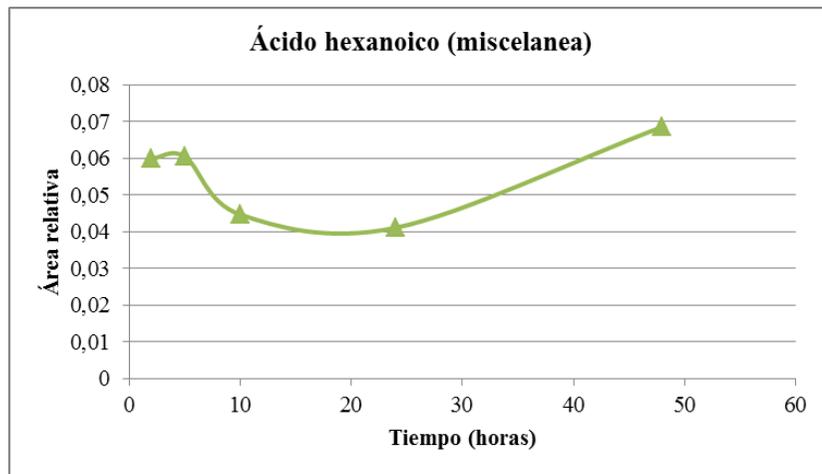
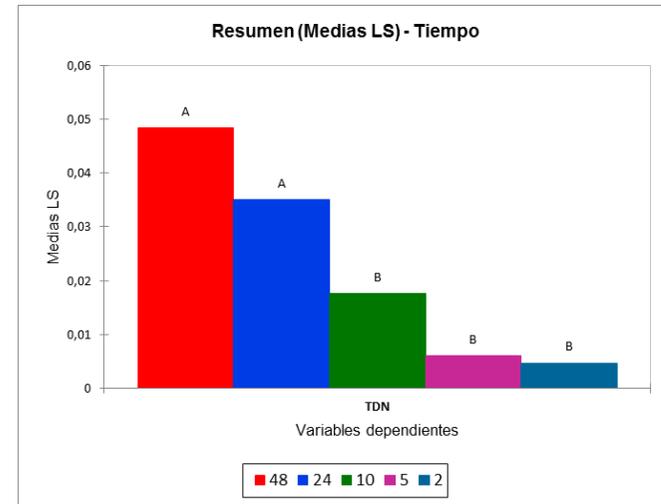
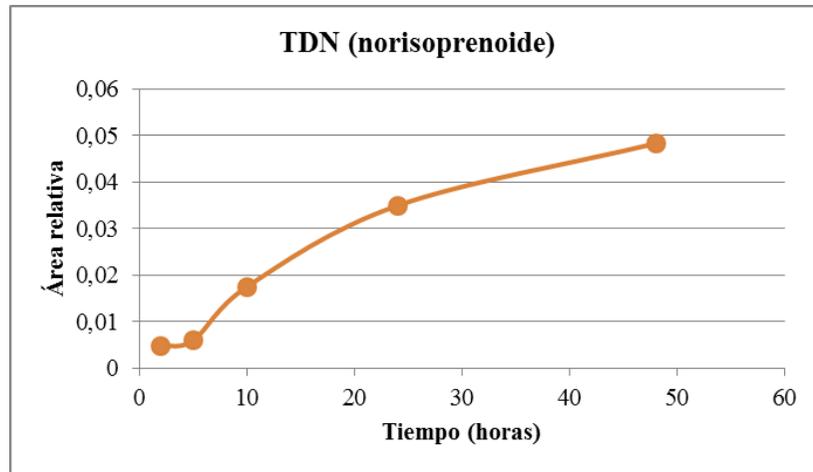
**Anexo VII:** Los gráficos de la izquierda representan la evolución de los compuestos a lo largo del proceso de envejecimiento a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Los gráficos de la derecha muestran los grupos de diferencias significativas existentes entre los distintos tiempos de envejecimiento.



**Anexo VII:** Los gráficos de la izquierda representan la evolución de los compuestos a lo largo del proceso de envejecimiento a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Los gráficos de la derecha muestran los grupos de diferencias significativas existentes entre los distintos tiempos de envejecimiento.

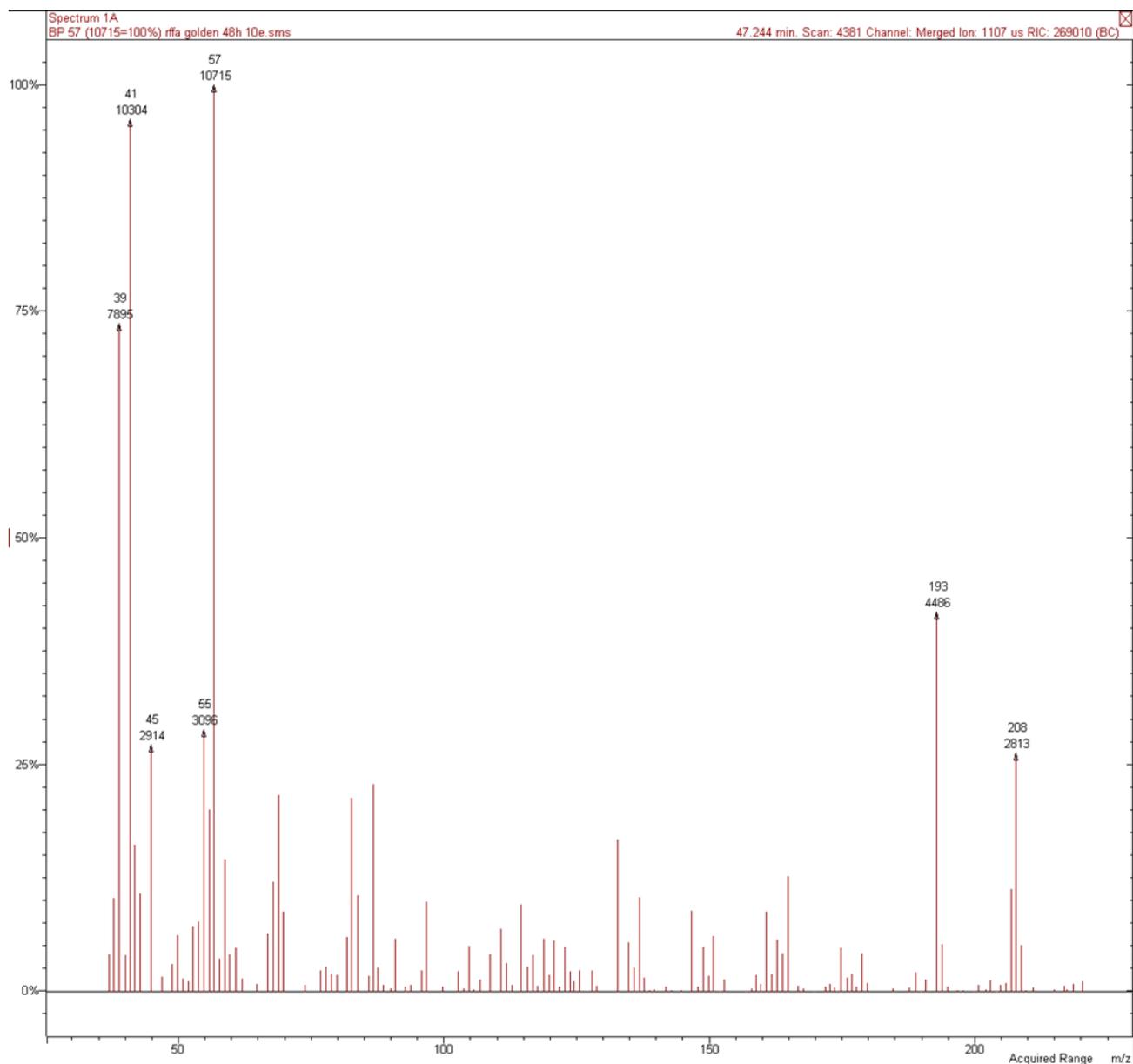


**Anexo VII:** Los gráficos de la izquierda representan la evolución de los compuestos a lo largo del proceso de envejecimiento a 75°C durante 2, 5, 10, 24 y 48 horas. Los gráficos de la derecha muestran los grupos de diferencias significativas existentes entre los distintos tiempos de envejecimiento.



8.8. Anexo VIII

Anexo VIII-i: Espectro de masas del norisoprenoide sin identificar 1.



Anexo VIII-ii: Espectro de masas del norisoprenoide sin identificar 2.

