

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Química Física y Analítica**

Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural  
Avanzado (Mención de Calidad)

**INFLUENCIA DEL ORIGEN Y LA  
TECNOLOGÍA DE ELABORACIÓN SOBRE  
EL PERFIL AROMÁTICO Y  
OLFATOMÉTRICO DE LA SIDRA**

**TESIS DOCTORAL**

**María José Antón Díaz**

Oviedo, 2015







## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

### 1.- Título de la Tesis

Español/Otro Idioma: Influencia del origen y la tecnología de elaboración sobre el perfil aromático y olfatométrico de la sidra

Inglés: Influence of origin and making technology on the aromatic and olfactometric profiles of cider

### 2.- Autor

Nombre: **María José Antón Díaz**

DNI/Pasaporte/NIE: \_\_\_\_\_

Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural Avanzado

Órgano responsable: Departamento de Química Física y Analítica

### RESUMEN (en español)

En esta Tesis Doctoral se planteó por primera vez la caracterización del perfil aromático de la sidra así como la identificación de aromas estructurales y diferenciadores mediante cromatografía de gases y olfatometría. Para ello, se han estudiado las siguientes fuentes de variación: origen, estado de maduración, crianza sobre *borras* y conservación en botella.

Entre los volátiles mayoritarios destacaron en todas las sidras analizadas los alcoholes amílicos, el acetato y el lactato de etilo. La fracción minoritaria estuvo compuesta principalmente por ácidos grasos, fenoles volátiles y alcoholes.

El análisis olfatométrico permitió identificar una estructura común a todos los tipos de sidra. Han sido identificados una serie de compuestos presentes en todas las muestras con valores de frecuencia modificada (%) elevada y que no aportan diferenciación entre muestras, que podrían ser considerados parte del esqueleto fundamental de la sidra. Entre ellos se encuentran ésteres de etilo y acetatos, ácidos grasos, fenoles volátiles, alcoholes, y otros odorantes como metional,  $\gamma$ -butirolactona, metionol,  $\gamma$ -decalactona y sotolón.

En este trabajo se abordó el estudio comparativo del aroma de sidras naturales asturianas y vascas en dos estados de maduración, observándose que acetato de propilo, 1-octen-3-ona, ácido 2-metilbutanoico, 2-feniletanol, 4-etilguayacol y sotolón permiten discriminar las sidras por su procedencia. Por su parte, 4-etilcatecol, 4-etilfenol, hexanol, ácido hexanoico,  $\gamma$ -butirolactona, el propionato de etilo y 4-vinilguayacol se encuentran correlacionados con la maduración.

La crianza sobre *borras* dio lugar a un incremento de la mayor parte de los compuestos analizados, en particular, ácidos grasos, alcohol, ésteres de etilo y 3-etoxi-1-propanol.

Con respecto a la influencia del periodo de conservación en botella, el perfil aromático de la sidra se mantuvo estable durante al menos seis meses a 12 y 20 °C. Transcurrido este tiempo, se observó una disminución de la concentración de los ésteres de etilo y acetatos, así como un aumento de 4-etilcatecol y ácido octanoico. El estudio olfatométrico reveló que el tiempo de conservación influyó de manera significativa en la percepción de ésteres, alcoholes, fenoles volátiles y otros compuestos como sotolón, alcanzándose un mínimo de intensidad olfatométrica transcurrido un año.

En este trabajo, también se ha evaluado la influencia de la composición aromática en las percepciones sensoriales. Este estudio puso de manifiesto la participación positiva en el atributo frutal del guayacol, eugenol, ácido *iso*-butanoico, 2-feniletanol, metional,  $\gamma$ -butirolactona y hexadecanoato de etilo y la negativa del ácido propanoico y el 4-vinilguayacol. Al atributo especiado contribuyeron fundamentalmente fenoles volátiles y el sotolón.

Por último, se abordó una descripción preliminar del aroma de sidras especiales: espumosas y de hielo. Las sidras espumosas presentaron perfiles olfatométricos menos complejos que las sidras naturales. En el caso de las sidras de hielo, se detectaron perfiles diferentes a los encontrados en otros tipos de sidra, siendo los alcoholes la familia mayoritaria, seguida de ácidos grasos y fenoles volátiles. En el análisis olfatométrico se detectaron ocho picos, no identificados por el momento y descritos principalmente como dulzones, exclusivos en este tipo de sidras.



## RESUMEN (en Inglés)

This Thesis deals with the characterization of the aromatic profile of cider, together with the identification of structural and differencing odorants by means of Gas Chromatography and Olfactometry. Such a precise analysis has never been conducted before.

To achieve this goal, different sources of variability were analyzed: origin, maturation stage, contact with lees and storage conditions in bottle.

Among the major volatile compounds, amyl alcohols, ethyl lactate and ethyl acetate were quantitatively relevant in all of the ciders studied. The minor fraction mainly consisted of fatty acids, volatile phenols and alcohols.

The olfactometric analysis allowed the identification of a structure which was common to all the cider types. Several non discriminating components with high values of modified frequencies (%) were identified. These odorants could be considered as part of the basic aromatic skeleton of cider. Amongst these components ethyl esters, acetates, fatty acids, volatile phenols, alcohols and others such as methional,  $\gamma$ -butyrolactone, methionol,  $\gamma$ -decalactone and sotolon were present.

In this work a comparative study of the aroma of Asturian and Basque ciders in two maturation stages was conducted. Components such as ethyl propionate, 1-octen-3-one, 2-methylbutanoic acid, 2-phenylethanol, 4-ethylguaiaicol and sotolon were correlated to their origin, whereas 4-ethylcatechol, 4-ethylphenol, hexanol, hexanoic acid,  $\gamma$ -butyrolactone, ethyl propionate and 4-vinylguaiaicol were correlated to the maturation stage. The contact with lees brought about a significant increase in the contents of almost all of the analyzed volatile compounds, those of fatty acids, alcohols, ethyl esters and 3-ethoxy-1-propanol being remarkable.

With regards to the shelf-life of ciders, their aromatic profiles kept stable for at least six months at 12 and 20° C. After this time, the contents of ethyl esters and acetates decreased while those of 4-ethylcatechol and octanoic acid increased. The olfactometric study showed that the storage period significantly influenced the perception of ethyl esters, alcohols, volatile phenols and sotolon, showing a minimum in the olfactometric intensity after one year in bottle.

The influence of the chemical composition on the sensory perceptions was also evaluated. The positive contribution of guaiaicol, eugenol, iso-butyric acid, 2-phenylethanol, methional,  $\gamma$ -butyrolactone and ethyl hexadecanoate on the fruity attribute was ascertained. On the contrary, 4-vinylguaiaicol and propanoic acid had a negative contribution. Volatile phenols and sotolon defined the spicy attribute.

Lastly, a preliminary description of the aroma of special ciders was made. The results showed that the aroma profiles of sparkling ciders were less complex than those of still ciders. The profiles of Ice ciders differed from those observed in the other types of ciders, alcohols followed by fatty acids and volatile phenols being the predominant families. The olfactometric analysis gave eight non-identified odorants, mainly described as sweet, which were exclusive to this kind of cider.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO,  
BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL AVANZADO

# INDICE

---

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1.    La sidra .....	3
1.1.1.    La sidra en el mundo .....	3
1.1.2.    La sidra en España.....	5
1.1.2.1.    El sector sidrero en el País Vasco .....	5
1.1.2.2.    El sector sidrero en Asturias .....	6
1.1.3.    Elaboración de los productos .....	8
1.1.3.1.    Sidra natural .....	8
1.1.3.2.    Sidra espumosa .....	11
1.1.3.3.    Sidra de hielo .....	13
1.1.4.    La investigación en sidra .....	14
1.2.    El análisis del aroma .....	17
1.2.1.    Análisis cuantitativo .....	18
1.2.1.1.    Métodos con disolvente .....	19
1.2.1.2.    Métodos sin disolvente.....	21
1.2.2.    Análisis olfatométrico .....	23
1.2.3.    Análisis sensorial.....	26
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>31</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>35</b>
3.1.    Materiales .....	37
3.2.    Preparación de muestras .....	37
3.3.    Condiciones cromatográficas .....	38
3.4.    Análisis olfatométrico.....	40
3.4.1.    Selección y entrenamiento de los jueces.....	40
3.4.2.    Verificación del grupo de jueces .....	42
3.4.3.    Método de análisis de las muestras .....	42
3.5.    Análisis sensorial .....	43
3.6.    Otros análisis .....	43
3.7.    Análisis estadísticos .....	46
<b>4. Sidra natural: influencia del origen y estado de     maduración.....</b>	<b>49</b>
4.1.    Introducción .....	51

4.2.	Aroma de la sidra tradicional: origen y maduración.....	52
4.2.1.	Muestras .....	52
4.2.2.	Resultados .....	52
4.3.	Tipificación de la sidra natural .....	65
4.3.1.	Origen de las sidras .....	66
4.3.2.	Maduración de las sidras .....	68
<b>5.</b>	<b>Influencia de la crianza sobre <i>borras</i> en el perfil aromático de la sidra natural .....</b>	<b>73</b>
5.1.	Introducción .....	75
5.2.	Diseño experimental .....	76
5.3.	Resultados .....	77
<b>6.</b>	<b>Sidra natural de nueva expresión: influencia de las condiciones de conservación .....</b>	<b>89</b>
6.1.	Introducción.....	91
6.2.	Descripción de sidras de nueva expresión de mercado .....	93
6.2.1.	Muestras.....	93
6.2.2.	Resultados .....	93
6.3.	Efecto de las condiciones de conservación en la composición aromática de la sidra.....	102
6.3.1.	Diseño experimental .....	102
6.3.2.	Resultados y discusión.....	103
6.4.	Influencia de la composición aromática en los perfiles sensoriales de la sidra .....	110
6.4.1.	Perfiles sensoriales de sidras de mercado.....	110
6.4.2.	Variación de los perfiles sensoriales de las sidras durante el período de conservación .....	111
6.4.3.	Modelos de predicción de atributos sensoriales .....	116
<b>7.</b>	<b>Sidras especiales .....</b>	<b>121</b>
7.1.	Introducción .....	123
7.2.	Sidra espumosa .....	124
7.2.1.	Muestras .....	124
7.2.2.	Resultados .....	125
7.3.	Sidra de hielo .....	132
7.3.1.	Muestras .....	132
7.3.2.	Resultados .....	132
<b>8.</b>	<b>Discusión general .....</b>	<b>139</b>
8.1.	Composición cuantitativa .....	141
8.2.	Perfiles olfatométricos .....	149

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>185</b>









## INDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.2.1</b>	Aplicaciones de métodos de extracción/preconcentración de compuestos volátiles para el análisis de otras bebidas fermentadas.....	20
<b>Tabla 1.2.2.</b>	Aplicaciones del análisis olfatométrico en vinos y cervezas.....	28
<b>Tabla 1.2.3.</b>	Selección de aplicaciones de análisis sensorial de bebidas fermentadas .....	30
<b>Tabla 3.4.1.</b>	Patrones utilizados en la elección del vocabulario para la descripción de las percepciones en el análisis olfatométrico .....	41
<b>Tabla 3.5.1.</b>	Referencias para la descripción de los atributos sensoriales de sidras de nueva expresión .....	44
<b>Tabla 4.2.1.</b>	Parámetros enológicos de las sidras estudiadas .....	53
<b>Tabla 4.2.2</b>	Composición volátil de las sidras analizadas en función de su procedencia y estado de maduración.....	57
<b>Tabla 4.2.3.</b>	Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas: descripción olfativa, identificación, frecuencias modificadas promedio, máxima y mínima y resultados de significación para los diferentes factores (procedencia y maduración).....	62
<b>Tabla 4.3.1.</b>	Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función del origen .....	66
<b>Tabla 4.3.2.</b>	Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función de la madurez, obtenidos a partir de las variables olfatométricas .....	68
<b>Tabla 4.3.3.</b>	Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función de la madurez obtenido a partir de la concentración aromática .....	70
<b>Tabla 5.3.1.</b>	Efecto del contacto con <i>borras</i> en la composición volátil (media de tratamientos $\pm$ DS) de las sidras estudiadas .....	78
<b>Tabla 5.3.2.</b>	Efecto de la aplicación de oxígeno y/o enzima en la composición volátil (media del tratamiento $\pm$ DS) de las sidras estudiadas .....	80

<b>Tabla 5.3.3.</b>	Odorantes significativamente influenciados por el contacto con <i>borras</i> .....	83
<b>Tabla 5.3.4.</b>	Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas .....	84
<b>Tabla 6.2.1.</b>	Características y métodos de elaboración de las sidras de nueva expresión de mercado analizadas .....	94
<b>Tabla 6.2.2.</b>	Composición volátil de las sidras estudiadas .....	96
<b>Tabla 6.2.3.</b>	Perfiles olfatométricos de las sidras de nueva expresión de mercado.....	99
<b>Tabla 6.3.1.</b>	Composición aromática de las sidras ( $\pm$ DS) tras el proceso de filtración y embotellado .....	104
<b>Tabla 6.3.2.</b>	Variación de perfiles olfatométricos en las sidras analizadas .....	109
<b>Tabla 6.4.2.</b>	Valores de intensidad promedio (%) de atributos de olor en sidras de nueva expresión en función de las condiciones de conservación.....	112
<b>Tabla 6.4.3.</b>	Características de los modelos de calibración y predicción de atributos sensoriales a partir de variables olfatométricas	116
<b>Tabla 6.4.4.</b>	Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 del atributo frutal .....	117
<b>Tabla 6.4.5.</b>	Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 del atributo especiado .....	119
<b>Tabla 6.4.6.</b>	Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 para la calidad aromática .....	119
<b>Tabla 7.2.1.</b>	Parámetros enológicos de las sidras analizadas .....	125
<b>Tabla 7.2.2.</b>	Composición volátil de las sidras analizadas .....	126
<b>Tabla 7.2.3.</b>	Perfiles olfatométricos de las sidras espumosas analizadas .....	130
<b>Tabla 7.3.1.</b>	Composición química de las sidras de hielo analizadas .....	132
<b>Tabla 7.3.2.</b>	Composición volátil de las sidras de hielo analizadas .....	133
<b>Tabla 7.3.3.</b>	Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas: descripción olfativa, identificación, frecuencias modificadas, frecuencia modificada promedio y resultados de significación .....	137

<b>Tabla 8.2.1.</b>	Unidades Activas de Olor (OAV) calculadas para las sidras estudiadas y diferentes tipos de vinos .....	151
---------------------	--	-----









## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.1</b>	Distribución de la producción de sidra entre países de la Unión Europea. Fuente: Asociación Nacional de Elaboradores de sidra del Reino Unido. Datos del año 2010 .....	3
<b>Figura 1.1.2</b>	Consumo de sidra a nivel mundial. Fuente: Kim Slater, datos del año 2009. Serie de conferencias “Cider and Fruit Wine: Local but Global”, AICV, Bruselas 2010 .....	4
<b>Figura 1.1.3</b>	Distintivo de la sidra acogida al sello de calidad <i>Eusko Label</i> .....	6
<b>Figura 1.1.4</b>	Producción de sidra y sidra natural en Asturias (Cosecha 2010/11). Fuente: Rubio Escalada, A. (2012) a partir de datos de SADEI .....	6
<b>Figura 1.1.5</b>	Distintivo de las sidras y sidras naturales acogidas a la DOP “Sidra de Asturias” .....	8
<b>Figura 1.1.6</b>	Proceso de elaboración de sidra natural .....	9
<b>Figura 1.1.7</b>	Prensas de “cajón” (izqda.) y neumática (dcha.) Por cortesía de Sidra “El Gobernador” (Villaviciosa) .....	10
<b>Figura 1.1.8</b>	Toneles de acero inoxidable y de madera. Por cortesía de Sidra “Cortina” y Sidra “El Gobernador” (Villaviciosa) .....	10
<b>Figura 1.1.9</b>	Proceso de elaboración de sidra.....	12
<b>Figura 1.1.10</b>	Pupitre con botellas colocadas (izqda.) y máquina para congelación de cuellos (dcha.). Por cortesía de “Valle, Ballina y Fernández” (Villaviciosa) .....	13
<b>Figura 1.1.11</b>	Proceso de elaboración de sidra de hielo .....	14
<b>Figura 3.5.1</b>	Ficha de evaluación sensorial de sidras naturales de nueva expresión.....	45
<b>Figura 4.2.1</b>	Compuestos volátiles mayoritarios en sidra natural tradicional .....	55
<b>Figura 4.2.2</b>	Cromatograma típico de un extracto de sidra natural .....	56
<b>Figura 4.3.1</b>	Proyección de las variables olfatométricas sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Referencia de las variables, ver Tabla 4.2.3 .....	67
<b>Figura 4.3.2</b>	Proyección de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales. N: Asturias; V: País Vasco .....	68
<b>Figura 4.3.3</b>	Proyección de las variables olfatométricas sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Referencia de las variables, ver Tabla 4.2.3 .....	69

<b>Figura 4.3.4</b>	Proyección de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales. Sidras maduras: N1-22; V1-10; Sidras jóvenes; N23-40; V11-20) .....	70
<b>Figura 4.3.5</b>	Proyección de los aromas en el plano formado por las dos primeras componentes principales .....	71
<b>Figura 4.3.6</b>	Proyección de los <i>scores</i> de las sidras sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Asturianas maduras: N1-20; asturianas jóvenes: N23-40; vascas maduras: V1-10; vascas jóvenes: V11-20 .....	72
<b>Figura 5.2.1</b>	Representación esquemática del diseño experimental .....	77
<b>Figura 5.3.1</b>	Proyección de las variables olfatométricas para el tratamiento con oxígeno. Referencia de las variables, ver Tablas 5.3.3 y 5.3.4 .....	87
<b>Figura 5.3.2</b>	Proyección de las variables olfatométricas para el tratamiento con enzima. Referencia de las variables, ver Tablas 5.3.3 y 5.3.4 .....	88
<b>Figura 6.3.1</b>	Esquema del diseño experimental .....	102
<b>Figura 6.3.2</b>	Representación de las variables químicas sobre el componente principal de temperatura .....	106
<b>Figura 6.3.3</b>	Representación de las variables químicas sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes al tiempo de conservación. t1: 1 mes; t2: seis meses; t3: doce meses .....	107
<b>Figura 6.3.4</b>	Representación de las variables cuantitativas sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes a la interacción entre los factores. t1: un mes; t2: seis meses; t3: doce meses .....	108
<b>Figura 6.4.1</b>	Gráfico de araña de los perfiles sensoriales de las sidras de mercado. Las puntuaciones mostradas corresponden a porcentajes de intensidad de percepción. (**): significativo al 5% ; (***) : significativo al 1%.....	111
<b>Figura 6.4.2</b>	Gráfico de araña de los perfiles sensoriales de las sidras durante el periodo analizado. Las puntuaciones mostradas corresponden a porcentajes de intensidad de percepción. (**): significativo al 5%; (***) : significativo al 1%.....	113
<b>Figura 6.4.3</b>	Representación de los atributos sensoriales sobre el componente principal de temperatura .....	114
<b>Figura 6.4.4</b>	Representación de los atributos sensoriales sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes al tiempo de conservación. t1: 1 mes; t2: seis meses; t3: doce meses	114

<b>Figura 6.4.5</b>	Representación de los atributos sensoriales sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes a la interacción entre los factores. t1: un mes; t2: seis meses; t3: doce meses .....	115
<b>Figura 6.4.6</b>	Pesos de las variables olfatométricas sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales del modelo frutal .....	117
<b>Figura 6.4.7</b>	Proyección de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales del modelo frutal .....	118
<b>Figura 8.1.1</b>	Principales ácidos hidroxicinámicos y sus derivados volátiles .....	145







**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

4-EC	4-Etilcatecol (4-etil-1,2-bencenodiol)
4-EF	4-Etilfenol
4-EG	4-Etilguayacol (4-etil-2-metoxifenol)
4-VC	4-Vinilcatecol (4-vinil-1,2-bencenodiol)
4-VG	4-Vinilguayacol (4-vinil-2-metoxifenol)
4-VP	4-Vinilfenol
Ác.	Ácido
AEDA	Análisis aromático por dilución de extractos (Aroma Extract Dilution Analysis, AEDA)
AENOR	Asociación Española de Normalización
AICV	Asociación Internacional de Sidra y Vinos de Fruta
ANOVA	Análisis de la varianza (Analysis of variance)
ASCA	(ANOVA) – Simultaneous Component Analysis
ASD	Análisis sensorial descriptivo
BOE	Boletín Oficial del Estado
BTE	Umbral mejor estimado (Best Threshold Estimated)
°C	Grado Celsius
c-	<i>cis</i>
CG	Cromatografía de gases (Gas Chromatography, GC)
COPAE	Consejo de la Producción Agraria Ecológica del Principado de Asturias
CP	Componentes principales
CRSA	Consejo Regulador “Sidra de Asturias”
d.i.	Diámetro interno
Dif.	Diferencia
DOP	Denominación de Origen Protegida
DS	Desviación estándar
F	Frecuencia de citación
FD	Factor de dilución
FID	Detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector)
FM	Frecuencia modificada



g	Gramo
G	Fuerza G
hL	Hectolitro
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
HS	Espacio de cabeza (Head Space)
I	Intensidad media
<i>i-</i>	<i>iso</i>
IDEPA	Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias
IPLA	Instituto de Productos Lácteos
IRL	Índice de retención lineal (Linear Retention Index, IRL)
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LDA	Análisis discriminante lineal (Lineal Discriminant Analysis)
LLE	Extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction)
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrometro
<i>m-</i>	<i>meta</i>
M	Millón
m	Pendiente
m	Metro
MANOVA	Análisis multivariante de la varianza (Multivariate Analysis of Variance)
Máx	Máximo
MELL	Microextracción líquido-líquido
MFA	Análisis factorial múltiple (Multiple Factor Analysis)
mg	Miligramo
min	Minuto
Mín	Mínimo
mL	Mililitro
mm	Milímetro

---

MS	Detector de espectrometría de masas (Mass Spectrometry)
m/z	Relación masa/carga
Nº	Número
N	Normalidad
nd	No detectado
ni	No identificado
nm	Nanómetro
ns	No significativo
O	Detector olfatométrico
o-	orto
OAV	Unidades activas de olor (Odor Active Values)
p	p-valor
p-	para
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLS	Mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares)
PVDF	Bifluoruro de polivinilideno (polyvinylidene difluoride)
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
R	Coefficiente de correlación
RMSEP	Error cuadrático medio de predicción (Root Mean Standard Error Prediction)
s	Segundo
SBSE	Extracción por adsorción con barras agitadoras (Stir Bar Sorption Extraction)
SEC	Error estándar de calibración (Standard Error Calibration)
SEP	Error estándar de predicción (Standard Error Prediction)
SERIDA	Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
SPME	Microextracción en fase sólida (Solid Phase Micro Extraction)
<i>t-</i>	<i>trans</i>
TD	Desorción térmica (Thermal Desorption)
TOF	Tiempo de vuelo (Time of Flight)

VE	Varianza explicada
v	volumen

## Introducción

### 1.1. La sidra

1.1.1. La sidra en el mundo

1.1.2. La sidra en España

1.1.2.1. El sector sidrero en el País Vasco

1.1.2.2. El sector sidrero en Asturias

1.1.3. Elaboración de los productos

1.1.3.1. Sidra natural

1.1.3.2. Sidra espumosa

1.1.3.3. Sidra de hielo

1.1.4. La investigación en sidra

1.1.4.1. Composición química de la sidra

### 1.2. El análisis del aroma

1.2.1. Análisis olfatométrico

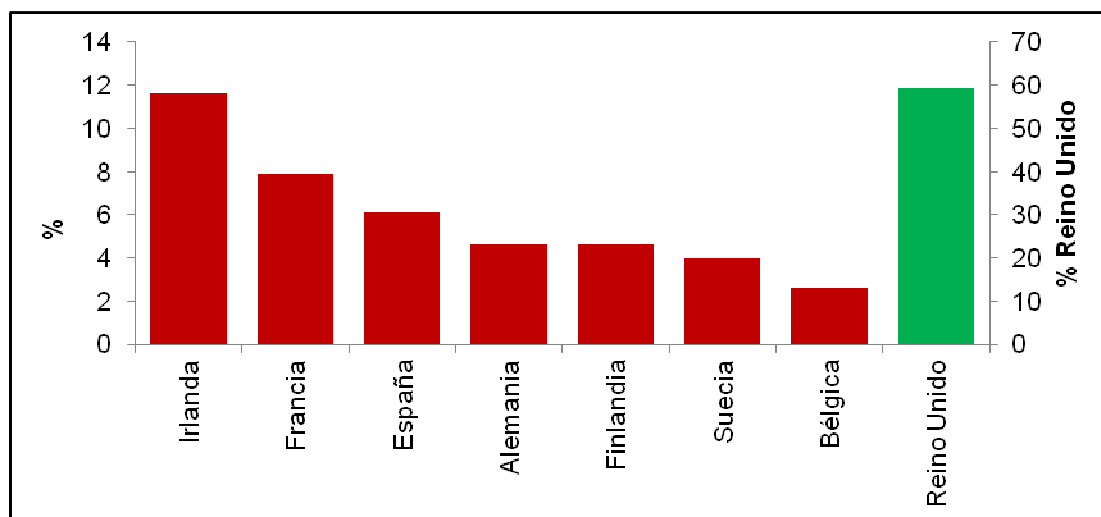
1.2.2. Análisis sensorial



## 1.1. La sidra

### 1.1.1 La sidra en el mundo

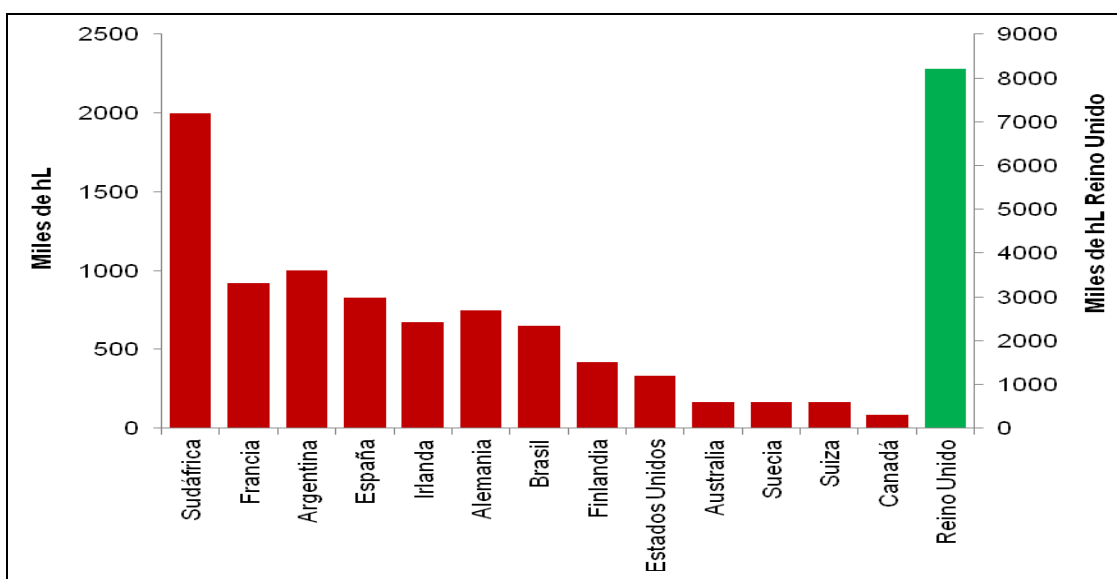
En Europa, el término SIDRA engloba una gran diversidad de productos derivados de la fermentación del zumo de manzana, puro o mezclado con pera, sin ningún tipo de alcohol destilado ([www.aicv.org](http://www.aicv.org)). Históricamente, la sidra ha sido, y es, un producto de gran tradición en los países de la costa atlántica europea, donde se elabora alrededor del 80% de la sidra que se consume a nivel mundial, destacando el Reino Unido como primer productor (Figura 1.1.1).



**Figura 1.1.1.** Distribución de la producción de sidra entre países de la Unión Europea. Fuente: Asociación Nacional de Elaboradores de sidra del Reino Unido. Datos del año 2010.

Este sector ha experimentado en los últimos años un formidable crecimiento, a pesar de la competencia de la cerveza y otras bebidas, y de la crisis económica surgida a partir de 2008. Las perspectivas de desarrollo son muy positivas, como lo demuestra la irrupción en el mercado de la sidra de grandes grupos cerveceros como Heineken, Foster o Stella Artois, con el lanzamiento de novedosas “sidras afrutadas” con sabores a grosella, frambuesa o arándanos, sidras sin alcohol o nuevas presentaciones de peradas ([www.drinksint.com](http://www.drinksint.com)).

El consumo de sidra está dominado por los países de habla inglesa, en particular el Reino Unido, en donde se realizan más del 59% de las ventas totales de la Unión Europea (Figura 1.1.2), y donde la sidra es la bebida del momento entre un sector significativo de jóvenes consumidores. En segundo lugar destaca Sudáfrica, con un mercado innovador en rápida expansión, y entre los países latinoamericanos, cabe citar a Argentina y Brasil, que copan más del 90% del consumo en esta zona del mundo (Ibáñez *et al.*, 2010).



**Figura 1.1.2.** Consumo de sidra a nivel mundial. Fuente: Kim Slater, datos del año 2009. Serie de conferencias “Cider and Fruit Wine: Local but Global”, AICV, Bruselas 2010.

El mercado británico es muy dinámico, caracterizado por el continuo desarrollo de nuevos productos dirigidos a nichos de mercado muy diversos, coexistiendo con formatos tradicionales acogidos a Indicaciones Geográficas de Origen (Herefordshire, Worcestershire y Gloucestershire). En países como Francia, España y Alemania el consumo de esta bebida está muy ligado a la tradición, y circunscrito en buena parte a las zonas de producción. Por último, cabe mencionar por su originalidad, la sidra de hielo de Canadá elaborada a partir de manzanas o mostos concentrados por congelación (Bénassi, 2010).

### 1.1.2. La sidra en España

En España la sidra constituye un emblema dentro de la gastronomía y la cultura del norte del país. De acuerdo con las cifras publicadas por la Asociación Internacional de Sidra y Vinos de Fruta (AICV), España elabora alrededor de 80M de litros, fundamentalmente en Asturias, seguida por el País Vasco. En la Orden del Ministerio de Agricultura de 1 de agosto de 1979 (BOE de 28 de agosto de 1979) se aprobó la Reglamentación vigente de esta bebida. Es objeto de esta disposición la definición de sidra, sidra natural y de otras bebidas derivadas de la manzana, sus prácticas de elaboración y características de los productos, así como las normas sobre embotellado y circulación de los mismos. Los principales productos del sector sidrero en España quedan definidos como:

**Sidra**: “bebida resultante de la fermentación alcohólica total o parcial de la manzana fresca o de su mosto. Su graduación alcohólica adquirida será superior a 4 grados”. Se admite en este producto la utilización de mostos procedentes de concentrados así como la adición de azúcar y anhídrido carbónico.

**Sidra natural**: “sidra elaborada siguiendo las prácticas tradicionales, sin adición de azúcares, que contiene gas carbónico de origen endógeno exclusivamente. Su graduación alcohólica adquirida será superior a 4,5 grados”.

#### 1.1.2.1. El sector sidrero en el País Vasco

La sidra es denominada “*sagardoa*” en el País Vasco. El sector experimentó una gran decadencia a principios del siglo XX, hasta que en los años 80 las Diputaciones Forales de Guipúzcoa y Vizcaya, pusieron en marcha diversas iniciativas con el fin de recuperar y mantener la tradición sidrera vasca.

Durante los últimos 15 años este sector ha introducido muchas mejoras en el proceso de elaboración y ha hecho un gran esfuerzo por la recuperación de variedades de manzana autóctonas. De forma paralela, la producción de



sidra natural está adquiriendo progresivamente mayor relevancia económica, lo que se demuestra con un incremento de que alcanza los 10M de litros actuales ([www.europapress.es/euskadi](http://www.europapress.es/euskadi)).

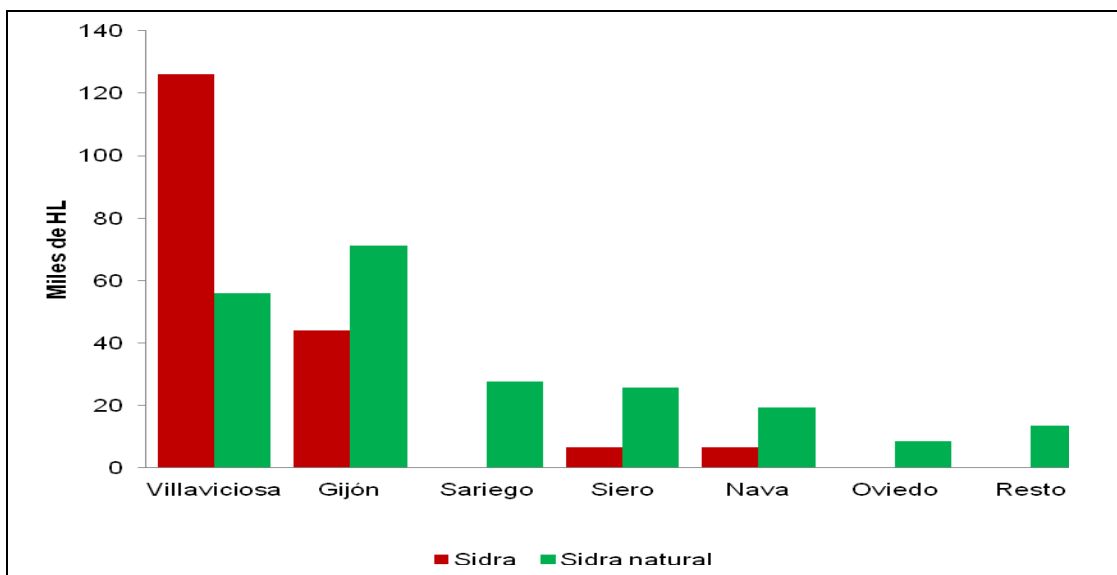
Existe en el País Vasco una Marca de Calidad (Figura 1.1.3): el *Eusko Label*, que acoge a las sidras naturales elaboradas únicamente con manzana autóctona, siguiendo las prácticas tradicionales y sometidas al control del Gobierno Vasco.



**Figura 1.1.3.** Distintivo de la sidra acogida al sello de calidad *Eusko Label*.

### 1.1.2.2. El sector sidrero en Asturias

Asturias aglutina el 80% de la producción de sidra española, lo que la convierte en la cuarta productora a nivel europeo. Esta actividad está localizada en la zona central asturiana, concentrándose en mayor proporción en los concejos de la Mancomunidad de la Sidra y Gijón (Figura 1.1.4).



**Figura 1.1.4.** Producción de sidra y sidra natural en Asturias (Cosecha 2010/11). Fuente: Rubio Escalada, A. (2012) a partir de datos de SADEI.

Hay en torno a una decena de empresas elaboradoras de sidra, que representan aproximadamente el 61% de la facturación total del sector. Este sub-sector posee una elevada capacidad tecnológica y de comercialización, de manera que la sidra constituye una de las partidas más importantes en el comercio exterior de la industria de bebidas asturianas. Los destinos principales de exportación coinciden con países con una fuerte presencia de descendientes asturianos: Cuba, República Dominicana, Estados Unidos, Venezuela, y México (Informe IDEPA-Principado de Asturias, 2009).

La sidra natural es producida en unos cien *llagares* inscritos en la región, representando el mercado asturiano el 93% del total. En este sub-sector conviven lagares con volúmenes de producción, recursos tecnológicos y niveles de distribución importantes, junto con pequeñas empresas familiares, con un nivel de actividad restringido y casi artesanal. A diferencia de la sidra, la sidra natural se consume tradicionalmente escanciada y en las clásicas *sidrerías* asturianas.

Desde la década de los 90 los lagares han mejorado tanto sus instalaciones como las técnicas de elaboración, apostando por la incorporación de modernas tecnologías (prensas rápidas, tanques de acero y fibra, control de temperatura, etc.), y por la diversificación de sus producciones para fomentar el consumo y alcanzar nuevos nichos de mercado. Fruto de este compromiso entre tradición e innovación, han surgido las sidras espumosas de segunda fermentación y la sidra natural de nueva expresión. Esta última es una sidra natural filtrada antes de su embotellado, lo que le confiere un aspecto transparente y brillante que permite prescindir del escanciado, facilitando su incorporación en el canal hostelero y de restauración.

En 2003 se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida "Sidra de Asturias" (BOE de 11 de febrero de 2003), en el que se establece como alcance de la marca a todo el territorio asturiano, amparando tanto a la sidra como a la sidra natural, elaboradas exclusivamente a partir de mostos frescos y con 22 variedades de manzana asturiana (Figura 1.1.5). El Consejo Regulador de la Denominación de Origen cuenta en la actualidad con

24 lagares, 278 cosecheros y 590 hectáreas registradas ([www.sidradeasturias.es](http://www.sidradeasturias.es)).



**Figura 1.1.5.** Distintivo de las sidras y sidras naturales acogidas a la DOP “Sidra de Asturias”.

Por otro lado, la Producción Ecológica se circunscribe a cuatro bodegas. Las sidras acogidas a esta figura de calidad deben ser elaboradas con manzanas cultivadas de acuerdo con las técnicas de agricultura ecológica, bajo el control del Consejo de la Producción Agraria Ecológica (COPAE).

Finalmente, hay que señalar que tres lagares han iniciado la comercialización de sidras de hielo, similares a las sidras canadienses.

### **1.1.3. Elaboración de los productos**

#### **1.1.3.1. Sidra natural**

La elaboración de la sidra natural comienza con la recogida de la manzana en otoño. Los frutos deben estar en un estado de maduración óptima y con unas buenas condiciones higiénico-sanitarias, por lo que se lavan y se seleccionan.

El proceso de extracción del mosto de manzana consta de dos etapas: la molienda o *mayado* y el prensado (Figura 1.1.6).

La molienda se efectúa generalmente con molinos de martillo que trocean el fruto. A continuación se lleva a cabo el prensado, único método de extracción de mosto legalmente permitido para la elaboración de sidra natural, pudiendo realizarse este proceso con distintos sistemas (Figura 1.1.7):

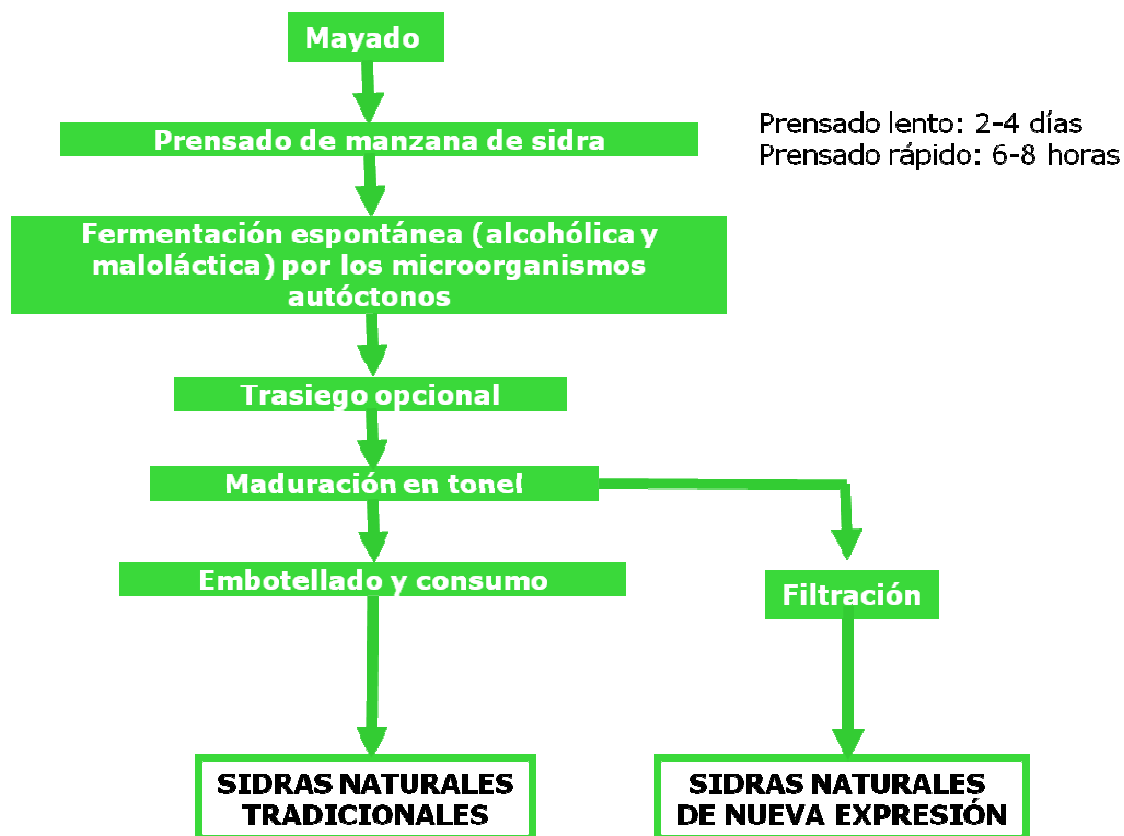
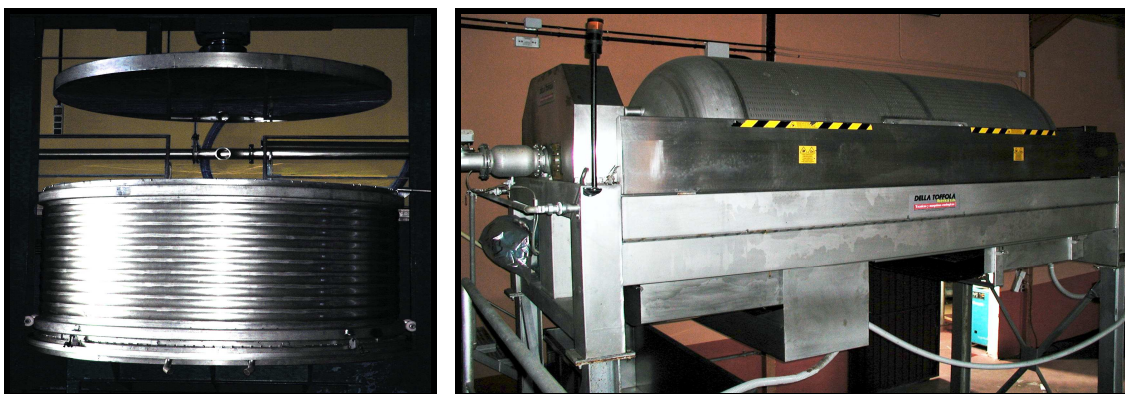


Figura 1.1.6. Proceso de elaboración de sidra natural.

*Prensas hidráulicas discontinuas verticales de “cajón” o “llagares”,* realizadas en madera o más comúnmente, en acero. Tienen forma cuadrada o cilíndrica y son movidas por dispositivos mecánicos o hidráulicos, que incorpora la posibilidad de controlar la temperatura y la presión del proceso. Se caracterizan por prensados lentos, en ciclos de 2-4 días, con rendimientos en torno al 75%, debiendo realizarse lo que en Asturias se denominan *cortes* y en el País Vasco *golpes*. Estos *cortes* o *golpes* consisten en remover la pulpa de manzana desde los bordes hacia la parte central y volver a prensar, con el fin de facilitar la salida del mosto e incrementar el rendimiento de extracción. Estas prensas proporcionan mostos muy limpios, ya que la propia masa de prensado actúa como un filtro.

*Prensas horizontales neumáticas,* formadas por un cilindro de acero inoxidable rotatorio horizontal con una membrana de goma flexible en su interior, de tal forma que una vez cargada la pulpa de la manzana se ejerce una presión sobre ella por la inyección de aire comprimido en el interior de la

membrana. Estas prensas trabajan en ciclos rápidos (6-8 horas) totalmente automatizados, obteniéndose rendimientos en torno al 70% y mostos con un alto contenido de sólidos. El uso de prensas neumáticas es muy habitual en la elaboración de sidra vasca y es cada vez más relevante en el sector sidrero asturiano.



**Figura 1.1.7.** Prensas de “cajón” (izqda.) y neumática (dcha.) Por cortesía de Sidra “El Gobernador” (Villaviciosa).

Una vez extraído el mosto, éste es bombeado hacia los toneles o tanques de fermentación, denominados *kupelas* en el País Vasco. Los toneles de madera de castaño son ampliamente utilizados en los lagares asturianos y vascos, aunque la dificultad de sus labores de limpieza y la constante necesidad de mantenimiento han hecho que el sector sidrero se decante por otros tipos de materiales, como la fibra de vidrio o el acero inoxidable (Figura 1.1.8).



**Figura 1.1.8.** Toneles de acero inoxidable y de madera. Por cortesía de Sidra “Cortina” y Sidra “El Gobernador” (Villaviciosa).

La transformación del mosto en sidra, se realiza de manera espontánea por la microbiota aportada por la materia prima y los útiles de bodega. El proceso más relevante es la fermentación alcohólica, realizada principalmente por levaduras fermentativas del género *Saccharomyces*, junto con la transformación maloláctica, conducida por bacterias lácticas.

Una vez finalizadas ambas fermentaciones, la sidra suele trasegarse a otro tonel donde tendrá lugar la fase de maduración, en la que la sidra experimentará cambios sensoriales notables, siendo recomendable efectuar controles periódicos de la bebida. Finalmente, la sidra se embotella y comercializa sin más tratamientos, en el caso de la denominada sidra tradicional, o bien se filtra a baja temperatura para obtener la sidra natural de nueva expresión, un producto con presencia en el mercado nacional desde el año 2003.

#### **1.1.3.2. Sidra espumosa**

La sidra espumosa se caracteriza, entre otros atributos, por una presión de anhídrido carbónico en botella comprendida entre 3 y 7 bares (20 °C). Dicha presión suele obtenerse por una segunda fermentación en recipientes cerrados.

El procedimiento de elaboración consta de dos etapas. En la primera, se parte de una sidra natural de calidad que haya realizado tanto la fermentación alcohólica como la maloláctica, denominada sidra base, que es estabilizada mediante trasiego, clarificación y filtración. (Figura 1.1.9)

La siguiente etapa consiste en forzar una segunda fermentación añadiendo a la sidra base el llamado *licor de tiraje*, compuesto por jarabe azucarado, levadura seleccionada, activador de fermentación y bentonita. El recipiente en el que tiene lugar la segunda fermentación establece las diferencias entre el sistema: tradicional, basado en el método *Champenoise*, y el *Granvas*, basado en el método *Charmat*.

En el sistema tradicional tanto la segunda fermentación o *toma de espuma* como la crianza sobre lías se desarrollan en la misma botella que va a llegar al consumidor. En este periodo, las botellas se colocan en posición horizontal (*fase de rima*) facilitando el máximo contacto entre levaduras y sidra.

Después, las botellas se colocan en los llamados pupitres, muebles de madera ligeramente inclinados, o en los “giropalet”, en los que tiene lugar la etapa de removido, en la que las lías se dirigen hacia el bocal permitiendo su eliminación una vez finalizado el periodo de crianza. Esta operación final, conocida como *degüelle*, se realiza congelando el cuello de la botella; de este modo se forma un tapón de hielo que contiene las lías y que permite su eliminación (Figura 1.1.10). La pérdida de sidra que se produce durante el *degüelle* se repone con el *licor de expedición*.

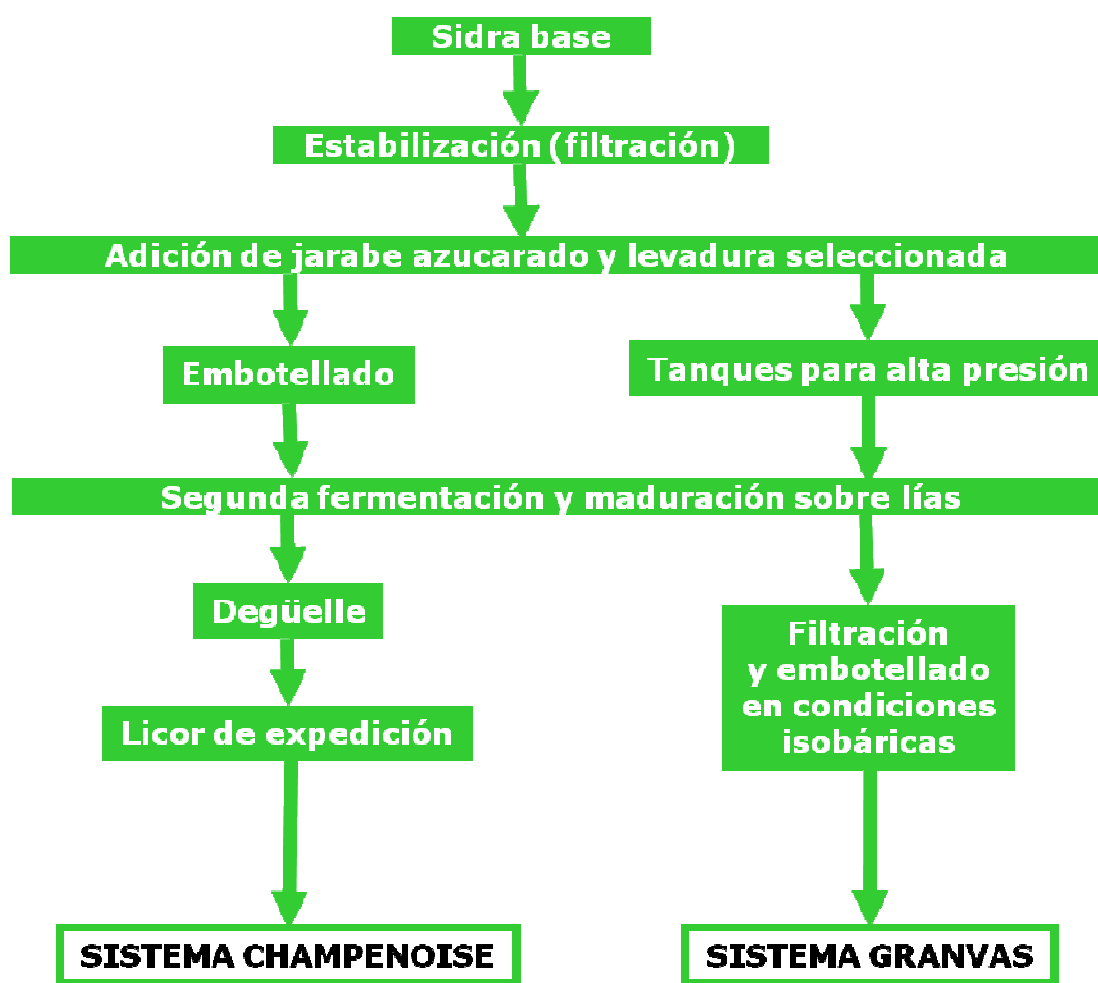


Figura 1.1.9. Proceso de elaboración de sidra.

En el sistema *Granvas*, la segunda fermentación tiene lugar en tanques de acero inoxidable aptos para soportar elevadas presiones. Completado el proceso de segunda fermentación y crianza, la sidra es clarificada, filtrada y embotellada en llenadoras isobáricas.



**Figura 1.1.10.** Pupitre con botellas colocadas (izqda.) y máquina para congelación de cuellos (dcha.). Por cortesía de “Valle, Ballina y Fernández” (Villaviciosa).

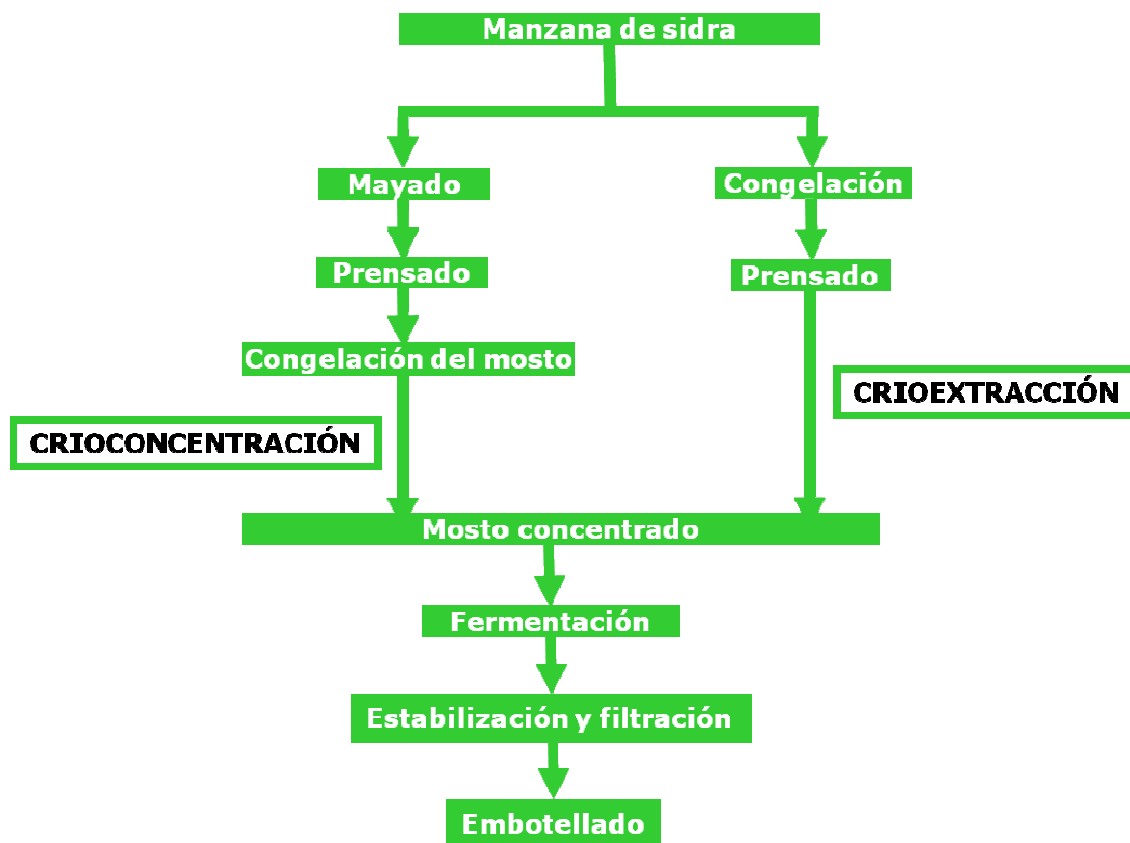
### 1.1.3.3. Sidra de hielo

Las sidras de hielo son obtenidas a partir de manzanas o mostos que han experimentado un enriquecimiento natural en azúcares por congelación, dando lugar a una sidra dulce con elevada graduación (Figura 1.11).

Su elaboración requiere, en primer lugar, una concentración de los mostos por crioextracción (prensado de manzanas congeladas) o por crioconcentración (congelación del mosto). Estos mostos enriquecidos se caracterizan por poseer un alto contenido de sólidos solubles, incluyendo azúcares, ácidos y compuestos nitrogenados, además de ser ricos en aromas y de elevada acidez. En segundo lugar, los mostos son fermentados por las levaduras.

Para elaborar este tipo de sidras en Asturias es necesario que la congelación del mosto o de la manzana se realice de forma artificial, obteniéndose bajos rendimientos (10-15%) en la obtención de estos mostos enriquecidos.





**Figura 1.1.11.** Proceso de elaboración de sidra de hielo.

Aún así, y en un intento importante de modernización del sector y de búsqueda de nuevos nichos de mercado, en el año 2011 se comercializaron las dos primeras sidras de hielo producidas en Asturias, y hoy son tres los *llagares* que incluyen esta bebida entre sus productos.

#### 1.1.4. La investigación en sidra

El mercado de la sidra tiene unas perspectivas de futuro muy prometedoras. Ello exige un continuo esfuerzo en investigación para responder a las demandas de diversos tipos de consumidores, bien mediante el desarrollo de formatos innovadores, o a través de la mejora y caracterización de los productos más tradicionales. Es, precisamente, en la sidra natural en la que se centrará esta Memoria de Tesis Doctoral.

En la actualidad una buena parte del conocimiento existente sobre el proceso de elaboración de la sidra procede de los trabajos realizados en el Reino Unido por Beech y Carr, (1977) y Lea (1995).

La sidra natural tradicional se elabora mediante la fermentación espontánea de los mostos obtenidos del prensado por los microorganismos aportados por el fruto y la bodega, en una sucesión que depende de las condiciones climáticas, variedades de manzana, localización geográfica y tecnología de elaboración (Cabranes *et al.*, 1990; Dueñas *et al.*, 1994; del Campo *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2007a). En este proceso conviven y compiten entre sí levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas.

En sidras asturianas se ha puesto de manifiesto la existencia de perfiles característicos de levaduras asociados a la propia bodega (Pando Bedriñana *et al.*, 2010), así como la influencia del sistema de prensado (tradicional o neumático) sobre el tipo de levaduras iniciales de los mostos (Suárez *et al.*, 2007a). En las primeras fases del proceso de elaboración predominan especies de levaduras no-*Saccharomyces*, que son relevantes para definir las características sensoriales de las sidras por su actividad enzimática (Pando Bedriñana *et al.*, 2012), y que generan concentraciones considerables de ésteres (Cabranes, 1998).

El resultado es una bebida seca y ácida, con una graduación alcohólica que oscila entre 5,0 y 7,0 (% v/v), en función de las características de la materia prima. En su composición no volátil predominan polialcoholes como el sorbitol y la glicerina, ácidos orgánicos como el láctico y el acético y compuestos fenólicos. Como peculiaridad de este producto, cabe reseñar los valores relativamente altos de acidez volátil admitidos (2,20 g ác. acético/L) en comparación con otras bebidas. Estos valores no siempre son cuestionables desde el punto de vista de la calidad (Picinelli *et al.*, 2000), sino que son apreciados por su influencia positiva en el aspecto visual de la sidra (Mangas *et al.*, 1999).

Los polifenoles son muy relevantes desde el punto de vista sensorial, ya que son responsables, entre otros atributos, de las sensaciones de amargor y

astringencia de los derivados de manzana (Lea y Arnold, 1978), y están asociados con las propiedades antioxidantes de la sidra (Picinelli Lobo *et al.*, 2009).

El perfil fenólico de la sidra depende principalmente de las variedades de manzana, y en cierta medida del procedimiento de prensado (Lea y Timberlake, 1974; 1978). Los sistemas de prensado largos favorecen una mayor oxidación y grado de polimerización de procianidinas, lo que podría explicar los menores niveles de polifenoles encontrados en las sidras españolas en comparación con las inglesas o francesas (Alonso-Salces *et al.*, 2004; Marks *et al.*, 2007; Rodríguez Madrera *et al.*, 2006). La presencia de contenidos importantes de ácidos dihidroxicinámicos, como el ácido hidrocafeico, es otra característica de las sidras asturianas (Rodríguez Madrera *et al.*, 2006).

Con respecto al aroma de la sidra, muchos de los trabajos encontrados hacen referencia a la evaluación de la influencia de diferentes factores tecnológicos sobre la fracción volátil mayoritaria.

Cabe mencionar, en primer lugar, los trabajos cualitativos realizados por Williams y Tucknott (1971, 1978), y los más recientes de Satora *et al.* (2008; 2009) y Vidrih y Hribar (1999), en los que se compararon los perfiles aromáticos obtenidos a partir de la fermentación de variedades de manzana de mesa. Sus resultados indican que la proporción de alcoholes superiores se relaciona con la variedad empleada. Asimismo, las características de acidez y concentración de polifenoles totales de los mostos influyen sobre la evolución de los microorganismos y la composición química de la sidra. Así, por ejemplo, niveles elevados de acidez y polifenoles disminuyen la velocidad de la fermentación alcohólica (del Campo *et al.*, 2008) y maloláctica (Salih *et al.*, 1987), y las manzanas en fase de senescencia proporcionan sidras más aromáticas (Braga *et al.*, 2013).

La influencia del tipo de prensado y de clarificación sobre el aroma de las sidras ha sido analizada en diferentes experimentos de fermentaciones controladas. En general, el prensado lento da lugar a mayores contenidos de acetato de etilo, ácidos volátiles y propanol y niveles inferiores de alcoholes

amílicos (Mangas *et al.*, 1993; del Campo *et al.*, 2003). Por su parte, el prensado rápido incrementa la concentración de alcoholes superiores y acetoína y disminuye el acetato de etilo, la acidez volátil y el metanol (Mangas *et al.*, 1993; González Calvo, 2004).

La formación de productos secundarios durante la fermentación alcohólica depende, en gran medida, de la sucesión de distintos géneros de levaduras y de las cepas predominantes (Arias-Abrodo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005b; Xu *et al.*, 2006). Los volátiles formados en esta fase representan cuantitativamente la mayor parte de los constituyentes del aroma (alcoholes y ésteres), además de otros muchos compuestos de distinta naturaleza.

La transformación maloláctica supone la degradación del ácido málico en ácido láctico por las bacterias lácticas. Esta fase transcurre simultánea o posteriormente a la fermentación alcohólica, dando lugar a una disminución de la acidez, mayor estabilidad biológica y modificaciones sutiles del aroma.

En la sidra natural destacan los alcoholes superiores y ésteres de etilo, como el acetato y el lactato (Pollard *et al.*, 1966; Picinelli *et al.*, 2000; Haider *et al.*, 2014). Los perfiles de ácidos grasos y ésteres de etilo minoritarios (Blanco Gomis *et al.*, 2001; Rodríguez Madrera *et al.*, 2005) han permitido discriminar sidras asturianas de acuerdo con la campaña de elaboración. Igualmente, la mayor concentración de acetatos de isoamilo y de hexilo permite diferenciar entre sidras dulces de dos regiones francesas, Normandía y Bretaña (Haider *et al.*, 2014).

## **1.2. El análisis del aroma**

En la sidra se pueden encontrar distintos compuestos aromáticos en función de factores tales como la variedad de manzana, el año de cosecha, las prácticas culturales, la fase pre-fermentativa, la fermentación, y las condiciones de conservación de la sidra. Los constituyentes del aroma de las bebidas, en general, han sido clasificados según su origen, distinguiéndose:

- *Aromas varietales*, provenientes del fruto y dependientes esencialmente de la variedad y de factores agroecológicos (fertilización, tratamientos fitosanitarios, condiciones edafoclimáticas, maduración, etc.).

- *Aromas pre-fermentativos*, formados desde la recolección hasta la fermentación alcohólica, y que incluyen la molienda, maceración, prensado y tipo de clarificación de los mostos.

- *Aromas fermentativos*, debidos a las levaduras y bacterias involucradas en la transformación de los mostos, así como a las condiciones que rigen el proceso fermentativo (pH, temperatura de fermentación, nutrientes, aireación, etc.). Estos aromas resultan ser los más abundantes cuantitativamente.

- *Aromas post-fermentativos*, constituidos por los compuestos volátiles que se forman durante la maduración de la sidra en el tonel, o con posterioridad, durante el embotellado.

### **1.2.1. Análisis cuantitativo**

La fracción aromática de las bebidas fermentadas es compleja de abordar debido, por un lado, a la gran diversidad de familias químicas que la integran y, por otro, al amplio rango de concentraciones, puntos de ebullición y polaridades posibles. La técnica apropiada para llevar a cabo la separación y determinación de estos compuestos es la cromatografía de gases (CG), por su gran capacidad de separación y versatilidad de acoplamiento con otras técnicas de análisis instrumental.

Desde el punto de vista cuantitativo los aromas encontrados en la sidra pueden agruparse en compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios. Entre los primeros, se encuentran productos típicos de la fermentación, como alcoholes superiores (propanol, *iso*-butanol, amílicos) y ésteres de etilo (acetato y lactato), junto con acetaldehído y metanol, los cuales están presentes en concentraciones de mg/L, suficientemente elevadas como para poder ser cuantificados por inyección directa (Suárez Valles *et al.*, 2005). Para la determinación de los volátiles minoritarios se requieren etapas de extracción y concentración como paso previo a su introducción en el sistema

cromatográfico. En esta fracción están descritos ácidos grasos de cadena media y larga, así como sus correspondientes ésteres de etilo, acetatos, alcoholes y fenoles volátiles (Williams y Tucknott, 1971).

En este sentido, hay que destacar que se han desarrollado distintos procedimientos que pueden ser agrupados en función del uso o no de disolventes. En la siguiente sección se recogen las aplicaciones de cada técnica en el análisis de derivados de la manzana, y en la Tabla 1.2.1 se resumen algunas aplicaciones en bebidas como cerveza o vino.

#### **1.2.1.1. Métodos con disolvente**

- **Extracción líquido-líquido (LLE)**

La extracción líquido-líquido está basada en el reparto de los analitos desde la muestra acuosa a un disolvente inmisible en agua. Es una técnica universal que permite la determinación de compuestos de diversas polaridades con una buena reproducibilidad y elevada sensibilidad. Por contra, es una técnica de manejo complejo y de difícil automatización y, además, el uso de disolventes orgánicos plantea ciertos problemas de tipo ambiental. La optimización de métodos de microextracción permite soslayar algunas de estas desventajas.

Las aplicaciones de esta técnica en el ámbito de la sidra se remontan a la década de los 70. Así, Williams y Tucknott, en 1971, caracterizaron cualitativamente el aroma de una sidra mediante dos extracciones en continuo de un destilado identificando un total de 43 componentes. La utilización de freón 113 permitió la identificación de 55 compuestos más (Williams y Tucknott, 1978) y la confirmación de muchos de los aromas descritos con anterioridad.

Posteriormente, Williams y May (1981) utilizaron una extracción en continuo permitiendo la identificación de nuevos compuestos, en particular, ésteres alifáticos de cadena larga.

**Tabla 1.2.1.** Aplicaciones de métodos de extracción/preconcentración de compuestos volátiles para el análisis de otras bebidas fermentadas.

Matriz	Compuestos analizados	Objetivo del trabajo	Método de análisis	Referencias
Vino	Alcoholes y ésteres	Diferenciación de vinos en función del sistema de elaboración	LLE/GC-FID y GC-MS	Spranger <i>et al.</i> , 2004
	Alcoholes, ésteres, acetatos y ácidos	Discriminación de vinos varietales griegos de acuerdo a su composición volátil	ELL/GC-MS	Dourtoglou <i>et al.</i> , 2014
	Ácidos, ésteres, alcoholes, aldehídos y cetonas	Validación de un método de análisis rápido de diversas clases de compuestos	MELL/GC-FID	Ortega <i>et al.</i> , 2001
	Fenoles volátiles, derivados de la vainillina, lactonas alifáticas, nor-isoprenoides, ésteres minoritarios y terpenoles	Determinación de compuestos minoritarios y traza en vinos	SPE/GC-Ion Trap-MS	López <i>et al.</i> , 2002
	Ésteres de etilo y acetatos, alcoholes, ácidos grasos y vitispiranos	Análisis de compuestos volátiles como marcadores de edad en vinos espumosos	(HS)-SPME/GC-MS	Francioli <i>et al.</i> , 2003
	Fenoles volátiles	Optimización de un método para el análisis de fenoles volátiles en vino	(HS)-SPME/GC-FID	Castro Mejías <i>et al.</i> , 2003
	Ésteres de etilo y acetatos, ácidos, alcoholes y vitispiranos	Estudio de la evolución de los compuestos volátiles del cava durante el envejecimiento	(HS)-SPME/GC-MS	Riu-Aumatell <i>et al.</i> , 2006
	Alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles, aldehídos, cetonas y lactonas	Caracterización de vinos sudafricanos	SBSE-TD/GC-MS	Tredoux <i>et al.</i> , 2008
	Fenoles volátiles	Optimización de un método de análisis de fenoles volátiles en vinos	SBSE-TD/GC-MS	Díez <i>et al.</i> , 2004
Cerveza	Perfiles volátiles	Caracterización del perfil volátil de cerveza	SPME/GC-MS	Rossi <i>et al.</i> , 2014
	Perfiles aromáticos	Caracterización del perfil aromático de cervezas con bajo contenido en alcohol	(HS)-SPME/GC-MS	Riu-Aumatell <i>et al.</i> , 2014

En sidras asturianas, la extracción líquido-líquido ha sido utilizada para determinar el perfil de ácidos grasos totales (Arias Abrodo *et al.*, 2005; Blanco-Gomis *et al.*, 2001; Margolles Cabrales *et al.*, 2003).

- **Extracción en fase sólida (SPE)**

La extracción en fase sólida es una técnica adecuada para aislar los volátiles de muestras muy diluidas. Se basa en la adsorción selectiva de los analitos sobre un soporte sólido, para posteriormente ser eluidos con un disolvente orgánico apropiado.

Hubert *et al.* (1990) utilizaron la extracción en fase sólida con columnas Extrelut<sup>®</sup> para la extracción de volátiles en sidra comercial, logrando identificar 50 compuestos, algunos de los cuales fueron descritos por primera vez en sidra, tales como el 1,3-octanodiol o el 5-octen-1,3-diol. Posteriormente, se desarrolló un método de extracción sólido-líquido sobre el mismo soporte (Mangas *et al.*, 1996; González Calvo, 2004), cuantificándose un total de 23 componentes volátiles en sidras asturianas, incluyendo alcoholes, ácidos grasos y 4-etilfenol.

Una variante de esta técnica es la microextracción por sorbentes empaquetados, que consiste en la miniaturización de SPE pasando del empleo de mililitros a microlitros, y fue empleada por Haider *et al.* (2014) para la cuantificación de 19 volátiles en sidras francesas.

#### **1.2.1.2. Métodos sin disolvente**

- **Espacio de cabeza (HS)**

Esta técnica consiste en la preconcentración de la fase vapor que se desprende de la muestra, que puede ser sólida o líquida, y su posterior inyección directa en el cromatógrafo.

Se puede distinguir entre técnicas de espacio de cabeza estático y dinámico. En la primera, los volátiles se extraen en un sistema cerrado, y a continuación, se inyecta directamente el vapor que se encuentra sobre la matriz. Recientemente, Braga *et al.* (2013) utilizaron esta técnica para evaluar



la influencia de la maduración y el tipo de manzana sobre el perfil aromático de zumos y fermentados de manzana.

En la técnica de espacio de cabeza dinámico, también denominadas de arrastre, se circula un gas inerte en el espacio de cabeza, arrastrando los analitos que habitualmente son recogidos y concentrados en una trampa fría o sólido adsorbente. Posteriormente, los compuestos retenidos son liberados por desorción térmica e inyectados en el cromatógrafo. Williams *et al.* (1978) empleando esta técnica identificaron 59 compuestos volátiles en sidra mediante el polímero poroso Porapak. En 2005, Rodríguez Madrera *et al.* validaron un método para el análisis de ésteres minoritarios en sidras basado en la técnica de “purga y trampa” sobre Tenax, identificándose 49 compuestos. Este método también fue aplicado para la determinación de alcoholes, ésteres y compuestos carbonílicos en sidras espumosas a lo largo del periodo de crianza (Rodríguez Madrera *et al.*, 2008).

- **Microextracción en fase sólida (SPME)**

Es una versión de la extracción en fase sólida en la que la retención de los analitos se basa en la absorción y/o adsorción (Kataoka *et al.*, 2000). Consiste en exponer una fibra recubierta con un polímero, insertada en un dispositivo similar a una jeringa, a los vapores de una muestra durante el tiempo necesario para alcanzar un equilibrio termodinámico entre la concentración de compuestos volátiles de la matriz y en la fase vapor; posteriormente, se retira la fibra y los analitos se desorben térmicamente en el cromatógrafo.

La aplicación de esta técnica en sidras es muy escasa, aunque cabe mencionar el trabajo de Pizarro *et al.* (2009) sobre el análisis de fenoles volátiles, o el de Wang *et al.* (2004) en la determinación de ésteres, alcoholes, ácidos grasos y fenoles volátiles. Este mismo grupo (Wang *et al.*, 2006) estudió el efecto que tienen las virutas utilizadas en el envejecimiento sobre la composición volátil de las sidras. Por su parte, Villière *et al.* (2012) determinaron las condiciones experimentales óptimas para la extracción de odorantes en sidras francesas, comparando métodos de SPME, espacio de

cabeza dinámico y “purga y trampa”, y resultando el primero el más adecuado para la obtención de extractos representativos.

Baltussen *et al.* (1999), introdujeron la denominada “stir bar sorption extraction” (SBSE) o extracción por adsorción con barras agitadoras; se trata de una variante de la SPME que utiliza barras magnéticas recubiertas de un polímero adsorbente, también denominadas *twisters*. Su aplicación es muy sencilla, ya que basta con introducir la barra en la matriz para que los compuestos sean retenidos por el adsorbente; posteriormente, éstos se liberan mediante desorción térmica y se analizan mediante cromatografía de gases. La SBSE aumenta la sensibilidad alrededor de 100 veces respecto a la SPME. Esta técnica, fue aplicada por Rodríguez Madrera y Suárez Valles (2011) en el estudio de los aromas de la *magaya*, y por Fan *et al.* (2011) para cuantificar alcoholes y ésteres en sidras chinas.

### **1.2.2. Análisis olfatométrico**

En un primer periodo de investigación en el campo de los aromas, se asumía que todos los compuestos presentes en los alimentos contribuían a su aroma. Sin embargo, el cálculo de las Unidades Activas de Olor (Odour Active Value, OAV), es decir, la relación entre la concentración de un compuesto y su umbral de detección, puso de manifiesto que no todos los compuestos presentes en un alimento son sensorialmente relevantes (Grosch, 2001). Estas unidades activas de olor proporcionan una idea sobre la aportación de un odorante al aroma global del producto en que se detecta. Si la concentración del compuesto es igual o superior al umbral de detección, la OAV será igual o mayor que 1 y el compuesto participará en el aroma, tanto más cuanto mayor sea el cociente. Se habla entonces de compuestos activos.

Es importante, por tanto, centrarse en el conocimiento de aquellos componentes responsables de las características sensoriales, positivas o negativas, del aroma. La técnica utilizada para alcanzar este objetivo es la olfatometría.

La olfatometría consiste en situar al final de una columna cromatográfica una nariz humana (juez o *sniffer*) que actúa como detector, en paralelo al detector convencional utilizado. Los datos proporcionados por esta metodología analítica incluyen distintas variables, como el índice de retención lineal (IRL), la descripción del olor y la medida de su intensidad (Acree, 1997).

La metodología empleada para la obtención de los extractos y la destreza de los jueces para la evaluación de los olores a medida que eluyen del sistema cromatográfico, son los factores más relevantes en la calidad del dato olfatométrico.

El extracto aromático ha de ser *representativo* de la muestra. La elección de una técnica concreta de extracción dependerá del objetivo de la investigación. Así, si el estudio está centrado en un compuesto concreto o en una familia de compuestos, el extracto ha de presentar una elevada recuperación de los mismos. Sin embargo, si el objetivo es comparar el aroma de diferentes muestras, el extracto ha de contener todos los compuestos importantes del aroma del mismo, en las mismas proporciones en que se encuentra en la matriz. Una manera de verificar la representatividad de un extracto consiste en llevar a cabo estudios sensoriales comparando el aroma del extracto obtenido con el del producto original (Plutowska y Wardencki, 2008).

Con respecto a los jueces participantes en el análisis olfatométrico, éstos deben seleccionarse por su sensibilidad, motivación, y capacidad para reconocer y cuantificar las sensaciones percibidas.

Se han desarrollado varias técnicas para recoger y procesar los datos olfatométricos y estimar la contribución de los compuestos activos de olor. Se pueden ser clasificar en tres categorías:

- *Métodos de medida de frecuencia de detección*, en los que un panel de jueces analiza un mismo extracto, registrándose para cada individuo los tiempos de retención en los que se detectan los aromas y su descripción. Al finalizar el análisis, se determina el número de jueces que perciben cada olor, de manera que aquellos detectados con mayor frecuencia son los que

presentan una mayor importancia. Esto se relaciona, a su vez, con la intensidad aromática. Es un método sencillo, que proporciona resultados reproducibles con un grado de entrenamiento corto.

- *Métodos de medida de intensidad*, en los que los jueces deben evaluar la intensidad o duración del olor percibido sobre escalas previamente definidas, su tiempo de retención y descripción, lo que requiere cierto entrenamiento en el uso de dichas escalas.

- *Métodos de dilución*, consistentes en analizar diluciones seriadas de un extracto hasta que no se percibe olor. Estas técnicas son muy útiles en la búsqueda de compuestos impacto, aquellos capaces de evocar el olor original de la muestra y que son identificados a partir de los pertinentes estudios de combinación y/u omisión (Guth, 1997). El más utilizado es el análisis aromático por dilución de extractos (AEDA, Aroma Extract Dilution Analysis), cuyos resultados se expresan como factores de dilución (FD). Estos se definen como la relación entre la concentración de un compuesto en un extracto, y la obtenida en la mayor dilución que es percibido (Grosch, 1993). Su principal desventaja es el tiempo necesario para llevarlo a cabo, por lo que suele ejecutarse con 1 ó 2 jueces muy sensibles. Ferreira *et al.* (2002a) han propuesto una dilución de 10 como óptima para su aplicación general.

La técnica olfatométrica ha sido aplicada en el análisis del aroma de manzanas. Así, Mehinagic *et al.* (2006) identificaron los compuestos volátiles más potentes y estudiaron la influencia del estado de maduración sobre los mismos en tres variedades (Golden Delicious, Fuji y Braeburn). Por su parte, Komthong *et al.* (2006) identificaron las unidades activas de olor (OAV) en manzanas de la variedad Fuji, encontrando que el 2-metilbutirato de metilo, el acetato de isoamilo, el butirato de etilo, el 2-metilbutirato de etilo, el formiato de isopentilo, el acetato de butilo y el acetato de hexilo son los principales contribuyentes al olor de la manzana. En el caso de la sidra los estudios olfatométricos son escasos. Williams y Tucknott (1978) asociaron tentativamente diferentes ésteres al carácter frutal de la sidra; Xu *et al.* (2007) identificaron los compuestos activos en dos sidras, mientras que Villière *et al.*

(2012) identificaron en sidras francesas ocho ésteres entre los componentes activos, y la presencia de trazas de 1-octen-3-ona.

En la Tabla 1.2.2 se recogen algunas aplicaciones del análisis olfatométrico al análisis de aromas de bebidas como el vino y la cerveza.

### **1.2.3. Análisis sensorial**

La evaluación de la calidad sensorial de la sidra es una tarea compleja, en la que están involucrados factores objetivos, como el olor, el sabor, o su aspecto visual, y subjetivos como, por ejemplo, la tipicidad, aquello que define a la sidra sobre la base de su origen o modo particular de elaboración o de consumo. La tipicidad es una propiedad clave en el reglamento de las diferentes figuras de calidad asociadas al origen (Denominación de Origen Protegida, Indicación Geográfica Protegida), y que fueron impulsadas en su día por la Unión Europea (UE) como herramientas de promoción de productos alimentarios. De hecho, la Comisión Europea ha reconocido la necesidad de los estudios de análisis sensorial de los alimentos y ha financiado programas de investigación en este campo (Tourila y Monteleone, 2009).

El aroma de la sidra está constituido por cientos de componentes volátiles, sin embargo, es evidente que su calidad sensorial no solo depende de la composición aromática, sino también de las interacciones entre todos los componentes, volátiles o no, a nivel molecular, las cuales deben evaluarse mediante análisis sensorial.

El análisis sensorial se define como un método científico utilizado para definir, medir, analizar e interpretar las respuestas que son percibidas de los productos a través de los sentidos. Esta ciencia multidisciplinar incluye el manejo de datos cualitativos o cuantitativos, de consumidores o catadores entrenados, y su evaluación mediante herramientas estadísticas adecuadas.

Esta disciplina del análisis es fundamental para el control de calidad de los alimentos y, a diferencia del análisis físico-químico, tiene una componente subjetiva importante que es preciso conocer y controlar (Meilgaard *et al.*, 1991). Los métodos de Análisis Sensorial Descriptivo (ASD) son los más empleados

para describir y cuantificar los caracteres organolépticos de un producto. El desarrollo de perfiles sensoriales tiene una gran utilidad para evaluar el impacto que los sistemas de elaboración, conservación o almacenamiento tienen sobre la calidad sensorial de un producto, o para certificar las características específicas de alimentos acogidos a Denominaciones de Origen, un campo de trabajo de gran potencial en la actualidad, y que exige el desarrollo y acreditación de métodos apropiados.

El aprendizaje de la evaluación sensorial comienza con el reconocimiento de los estímulos, siendo el lenguaje una de las herramientas más importantes en el ASD. La selección de los términos a emplear y su medida, son aspectos muy relevantes, de ahí que esta técnica requiera un exhaustivo entrenamiento y control de los catadores.

En el campo de los derivados de la manzana, estas técnicas sensoriales se han aplicado en la evaluación de diversos tratamientos para la conservación de zumos de manzana (Boylston *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003), o en la predicción de atributos sensoriales a partir de la composición aromática de aguardientes de sidra (Picinelli Lobo *et al.*, 2005).

En la sidra los trabajos son escasos. Williams (1975) definió el vocabulario para la descripción del aroma de sidras y peradas. A pesar de que en la lista final se incide en exceso en los posibles defectos, este trabajo propone referencias útiles para el entrenamiento de los jueces. En esta línea, Léguérinel *et al.* (1987a) seleccionaron una serie de términos mediante análisis de correlación para el análisis sensorial de sidras francesas.

**Tabla 1.2.2.** Aplicaciones del análisis olfatométrico en vinos y cervezas.

Matriz	Objetivo del trabajo	Preparación de la muestra	Referencias
Vino	Identificación de odorantes impacto en vinos blancos de diferentes variedades	ELL	Guth, 1997
	Aislamiento e identificación de odorantes generados en el vino durante la oxidación	ELL	Escudero <i>et al.</i> , 2000
	Selección de odorantes impacto y validación sensorial de la importancia de los mismos en vinos Chardonnay	ELL	Lorrain <i>et al.</i> , 2006
	Estudio de la composición volátil, olfatométrica y sensorial de vinos base y sus correspondientes vinos espumosos	ELL	Torrens <i>et al.</i> , 2010
	Identificación y cuantificación de odorantes impacto en vinos tintos de La Rioja	SPE	Aznar <i>et al.</i> , 2001
	Estudio del aroma de seis vinos tintos españoles de calidad	SPE	Culleré <i>et al.</i> , 2004
	Caracterización del aroma de los vinos Macabeo y estudio de la importancia de los compuestos con bajas OAV	SPE	Escudero <i>et al.</i> , 2004
	Predicción de las características sensoriales del vino en función de la uva empleada	HS-SPE	Campo <i>et al.</i> , 2005
	Caracterización analítica del aroma de cinco vinos españoles de calidad y estudio de los aromas frutales	HS-SPE	Escudero <i>et al.</i> , 2007
	Caracterización química del aroma de vinos de postre y vinos blancos espumosos	HS-SPE	Campo <i>et al.</i> , 2008
	Estudio de la composición aromática de 25 vino tintos españoles	HS-SPE	Ferreira <i>et al.</i> , 2009
Estudio de las relaciones entre composición y aroma. Contribución de compuestos odorantes al aroma del vino mediante AEDA	SPME	Martí <i>et al.</i> , 2003	
Cerveza	Identificación de odorantes impacto en diferentes tipos de cerveza	SPE	Evans <i>et al.</i> , 1999
	Identificación de compuestos aromáticos derivados del lúpulo en la cerveza utilizando un experimento AEDA	SPE	Lermusieau <i>et al.</i> , 2001
	Estudio de la importancia del metional y el fenilacetaldehído en la estabilidad del sabor de la cerveza, como participantes directos o como indicadores del deterioro del aroma.	ELL	Soares da Costa <i>et al.</i> , 2004

Estas sidras son descritas como dulces, frutales y perfumadas, y construyen modelos matemáticos multivariantes con elevados coeficientes de determinación para predecir cinco atributos a partir de la composición química (Léguérinel *et al.*, 1987b).

El uso de técnicas estadísticas multivariantes es esencial para el análisis de datos sensoriales (Noble y Ebeler, 2002). El equipo de trabajo del INRA ha caracterizado más de 90 sidras francesas, categorizadas según sistemas de elaboración (tradicional o industrial), mediante análisis factorial múltiple (MFA) y datos sensoriales descriptivos y de composición química (Le Quéré *et al.*, 2006).

En la Tabla 1.2.3 se resumen algunas aplicaciones del análisis sensorial al análisis de bebidas fermentadas.

A la vista de lo expuesto, en este trabajo experimental se ha seleccionado la extracción líquido-líquido para la concentración de las muestras ya que es una técnica conservadora, que permite obtener extractos muy representativos del aroma original (Aznar *et al.*, 2001; Callejón *et al.*, 2008; Plutowska y Wardencki, 2008), Así mismo, se ha elegido un método de análisis olfatométrico de medida de la frecuencia e intensidad de detección, por proporcionar información completa del perfil olfatométrico de las muestras y un método de análisis sensorial descriptivo, por su utilidad a la hora de describir y cuantificar las características sensoriales de una bebida.



**Tabla 1.2.3.** Selección de aplicaciones de análisis sensorial de bebidas fermentadas.

Producto	Objetivo del trabajo	Metodología	Referencias
Vinos	Acreditación de método de análisis sensorial descriptivo de vinos de Rioja Alavesa y Txacolí	Selección, entrenamiento y seguimiento de catadores según criterios AENOR  Desarrollo y control de las referencias para el entrenamiento  Sistematización del método de puntuación de calidad	Etaio <i>et al.</i> , 2010a, b Etaio <i>et al.</i> , 2012
	Descripción de atributos sensoriales de vinos tintos y su influencia en la percepción de la calidad	Clasificación según características Frecuencia de citación de atributos	Sáenz-Navajas <i>et al.</i> , 2011
	Validación estadística de datos sensoriales	Evaluación de modelos de ANOVA (efectos fijos, aleatorios y modelos mixtos)	Carlucci y Monteleone, 2001
	Descripción del aroma representativo de vinos de Sauvignon blanc de Nueva Zelanda, y su correlación con la composición química	Clasificación según caracteres Ordenamiento según grado de tipicidad Análisis sensorial descriptivo y análisis multidimensional Análisis químico de aromas	Parr <i>et al.</i> , 2007
	Caracterización sensorial de vinos de Chardonnay de diferentes zonas de Canadá	Análisis Descriptivo Cuantitativo	Schlosser <i>et al.</i> , 2005
	Predicción de atributos sensoriales a partir de odorantes activos	Clasificación según características Tests triangulares para evaluar el efecto de un compuesto sobre el atributo sensorial Relaciones sensorial-composición por PLS	San-Juan <i>et al.</i> , 2011
Cerveza	Identificación y definición de los atributos sensoriales que constituyen la sensación en boca de la cerveza	Uso del análisis sensorial descriptivo y PCA	Langstaff <i>et al.</i> , 1991
	Evaluación de la influencia de compuestos relacionados con el carácter rancio	Determinación del Umbral Mejor Estimado (BTE)	Saison <i>et al.</i> , 2009

**Objetivos**

---



En esta Tesis Doctoral se han planteado los siguientes

## **OBJETIVOS GENERALES:**

1. Caracterización del perfil aromático de la sidra.
2. Identificación de aromas estructurales y diferenciadores en función del origen y del método de elaboración.

Estos se abordan a partir de un plan de trabajo en el que se estudia la influencia de diferentes factores tecnológicos sobre la composición aromática de esta bebida mediante el análisis cuantitativo y olfatométrico de los distintos tipos de sidra natural presentes en el mercado español. Cada uno de estos objetivos es desarrollado en los correspondientes capítulos de esta Memoria.

En el Capítulo 4, se estudia el efecto del origen y estado de maduración sobre la composición de sidra natural tradicional. Para ello se analiza el perfil aromático de sidras asturianas y vascas muestreadas en dos fases de maduración (sidras maduras y jóvenes).

En el Capítulo 5 se evalúa el impacto de la crianza sobre *borras* y su influencia en el aroma de la sidra natural tradicional. Se comparan los perfiles aromáticos resultantes del contacto de la sidra con *borras* y diferentes combinaciones de enzima y microoxigenación.

En el Capítulo 6 se examina la influencia sobre el perfil aromático de la sidra natural de nueva expresión de las condiciones de almacenamiento en botella durante un año.

En el Capítulo 7 se describe el aroma de sidras especiales, analizando seis sidras espumosas y tres sidras de hielo.



**Materiales  
y métodos**

**3.1. Materiales**

**3.2. Preparación de muestras**

**3.3. Condiciones cromatográficas**

**3.4. Análisis olfatométrico**

3.4.1. Selección y entrenamiento de los jueces

3.4.2. Verificación del grupo de jueces

3.4.3. Método de análisis de las muestras

**3.5. Análisis sensorial**

**3.6. Otros análisis**

**3.7. Análisis estadísticos**



### 3.1. Materiales

Los patrones de los compuestos volátiles (pureza mínima del 98%) han sido proporcionados por Sigma (St. Louis, MO, USA), Aldrich (Gillingham, U.K.), y Flucka (Buchs, Suiza). Todos los reactivos, pentano (Merck, Darmstadt, Alemania), diclorometano, etanol absoluto, sulfato de amonio y sulfato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España), fueron de calidad cromatográfica, y el agua, de calidad tipo I, fue obtenida con un equipo Milli-Q Synthesis A-10 de Millipore (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Los filtros de PVDF (bifluoruro de polivinilideno) y de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  fueron suministrados por Teknokroma (Barcelona, España).

Los experimentos de maduración sobre *borras* se realizaron con una preparación comercial de  $\beta$ -glucanasa y un difusor DosiOx múltiple para la microoxigenación, ambos suministrados por Agrovin (León, España). El oxígeno empleado (Ultrapure Plus) fue de Carbuos Metálicos (Barcelona, España).

El tipo y número de muestras analizadas se detallan en cada capítulo.

### 3.2. Preparación de muestras

Para llevar a cabo el análisis de compuestos volátiles mayoritarios, las muestras fueron microfiltradas a través de acetato de celulosa. Las sidras de hielo, por tratarse de bebidas siruposas con un alto contenido en azúcares, fueron previamente destiladas de acuerdo con el método oficial de determinación del grado alcohólico de bebidas espirituosas (Métodos UE, 1998).

Para el análisis olfatométrico y cuantitativo de los compuestos volátiles minoritarios las muestras se filtraron a través de algodón hidrófilo y se homogeneizaron mediante agitación magnética (2 min). Se añadieron 45 gramos de sulfato de amonio a 150 mL de muestra, ajustando el pH a 3,00 con ácido clorhídrico. A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido, en



embudos de decantación de 250 mL, utilizando 30 mL de una mezcla de pentano:diclorometano (2:1, v/v) y agitación (10 min;  $20 \pm 2$  °C). La fase acuosa se eliminó y se lavó el embudo con 5 mL de la mezcla extractante, que se añadieron a la fase orgánica. Ésta fue centrifugada a 20.000 G, (5 °C, 10 min). A continuación, se recogieron 20 mL y se filtraron a través de papel de filtro (Whatman 1PS) y sulfato de sodio anhidro. Esta fase orgánica se lavó con la mezcla extractante y se concentró en un evaporador Turbo Vap II™ (Zymark, Caliper Life Sciences MA, USA) a 30 °C bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 0,5 mL. Los extractos fueron filtrados a través de una membrana de PVDF.

### 3.3. Condiciones cromatográficas

Los compuestos volátiles mayoritarios (acetaldehído, metanol, acroleína, acetato de etilo, 1-propanol, *iso*-butanol, 2-butanol, acetoína, alcoholes amílicos, alcohol alílico, lactato de etilo y 2-feniletanol) se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna semicapilar TR-FFAP (30 m × 0,53 mm d.i.; espesor de fase 1,0 μm, Teknokroma, Barcelona, España) acoplada a una precolumna polar. Las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo (1 μL) en modo *splitless*, utilizando helio como gas portador (10 mL/min). La temperatura del inyector y del detector fue de 240 °C y 275 °C, respectivamente. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: isoterma (40 °C) durante 4 minutos seguido de un incremento lineal de 4 °C/min hasta 60 °C. A continuación, una rampa de 10 °C/min hasta alcanzar 220 °C e isocrático durante 15 minutos.

La cuantificación se realizó por el método del patrón externo a partir de las correspondientes rectas de calibración preparadas en etanol:agua (5:95 v/v). Las muestras se analizaron por triplicado.

La fracción de compuestos volátiles minoritarios, constituida por ocho alcoholes (3-metil-3-butanol, 1-pentanol, 3-metil-2-butenol, 3-metil-1-pentanol, hexanol, *trans*-3-hexenol, *cis*-3-hexenol, y alcohol bencílico), siete ésteres de

etilo (propionato, butirato, 2-metilbutirato, hexanoato, octanoato, 3-hidroxi-1-butirato y 4-hidroxi-1-butirato), tres ácidos grasos (hexanoico, octanoico y decanoico), cuatro acetatos (propilo, butilo, isoamilo y 2-feniletilo), cuatro fenoles volátiles (4-etilguayacol, 4-etilfenol, 4-vinilguayacol y 4-etilcatecol), 3-etoxi-1-propanol,  $\gamma$ -butirolactona y metionol, fue analizada en el cromatógrafo antes descrito y una columna DB-WAX (30 m x 0,32 mm d.i., 0,50  $\mu$ m, J&W Folson, CA, USA). Los extractos fueron inyectados en el cromatógrafo (1  $\mu$ L) en modo *split* (1/50) utilizando helio como gas portador (3 mL/min). La temperatura del inyector y el detector fue de 275 °C. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: isoterma (40 °C) durante 5 minutos seguido de un incremento lineal de 3 °C/min hasta alcanzar 135 °C, una segunda rampa de 1 °C/min hasta una temperatura de 225 °C e isocrático durante 5 minutos.

La cuantificación se realizó por el método del patrón externo a partir de las correspondientes rectas de calibración preparadas en pentano:diclorometano (2:1). El 4-hidroxi-1-butirato de etilo fue expresado como 3-hidroxi-1-butirato de etilo por no disponer de patrón comercial. Las muestras se analizaron por triplicado.

Cabe puntualizar que el hexanol es un alcohol varietal mayoritario que coeluye con el lactato de etilo en las condiciones cromatográficas de análisis de volátiles mayoritarios, por lo que se analiza en la fracción minoritaria.

Adicionalmente, para confirmar la identidad de los compuestos volátiles y la ausencia de interferencia de picos coeluyentes, las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7890 equipado con un detector espectrométrico de masas 5975C, en modo ion total (SCAN) en el rango m/z 40-400 (2,6 scan/s). La identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación de sus espectros recogidos en la biblioteca Willey 138, y confirmados por co-inyección de los patrones puros, cuando fue posible. La inyección (1  $\mu$ L) se realizó en modo *splitless*.

El análisis olfatométrico se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890N dotado con detector de ionización de llama (FID),

acoplado a un puerto olfativo 275 (Ingeniería Analítica, S.L., Barcelona, España) calentado a 220 °C y conectado por un divisor de flujo a una columna DB-WAX (30 m x 0,32 mm d.i.; 0,50 µm de J&W Folson, CA, USA). Los extractos fueron inyectados en el cromatógrafo en modo *splitless* utilizando helio como gas portador (3 mL/min). La temperatura del inyector y del detector fue de 275 °C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: isoterma (40 °C) durante cinco minutos, rampa de temperatura de 4 °C/min hasta 100 °C, segunda rampa de 6 °C/min hasta alcanzar 200 °C, isocrático a esta temperatura durante 4 minutos, nueva rampa de 10 °C/min hasta alcanzar 225 °C seguida de isocrático durante 5 minutos.

Los odorantes fueron identificados por comparación de sus olores e índices de retención cromatográficos con los de los patrones puros en la columna DB-WAX. Dicha identidad fue confirmada mediante la inyección en una columna DB-5 (30 m x 0,32 mm d.i.; 0,25 µm de J&W Folson, CA, USA) y por CG-MS en las condiciones establecidas para el análisis olfatométrico.

### **3.4. Análisis olfatométrico**

#### **3.4.1. Selección y entrenamiento de los jueces**

El análisis olfatométrico fue realizado por voluntarios pertenecientes al personal del SERIDA y del IPLA. Respondieron a la convocatoria 11 personas, las cuales realizaron dos pruebas de selección.

La primera consistió en el reconocimiento y descripción de algunos olores familiares, presentados en disoluciones de etanol al 6%, en concentraciones apropiadas para asegurar su detección por parte de los candidatos. Esta prueba se realizó dos veces, tomándose como criterio de aceptación del candidato el obtener un porcentaje de aciertos superior al 50%.

La segunda prueba de selección consistió en el emparejamiento de olores. Para ello se presentaron ocho muestras distribuidas en dos series de cuatro, y codificadas aleatoriamente. Esta prueba se realizó dos veces, tomándose como criterio de aceptación un porcentaje de aciertos del 75%. Fueron seleccionadas 10 personas para el posterior entrenamiento.

Este se dividió en dos fases, la primera consistió en cuatro sesiones de 20-30 minutos, en las que los participantes memorizaban una serie de olores, agrupados en categorías tales como frutal, floral, herbáceo, especiado, graso, fenólico. En cada sesión se discutió sobre las descripciones dadas a los patrones y las asociaciones que estos evocaban, hasta alcanzar los términos de consenso adecuados. En la Tabla 3.4.1 se muestran las correspondientes disoluciones patrón y el vocabulario de trabajo finalmente seleccionado.

**Tabla 3.4.1.** Patrones utilizados en la elección del vocabulario para la descripción de las percepciones en el análisis olfatométrico.

Compuesto	(mg)/L)*	Descripción consenso
2-Metilbutirato de etilo (1)	3	Frutal, manzana
Acetato de isoamilo (2)	5	Frutal, plátano
c-3-Hexenol (3)	20	Herbáceo
Acetato de 2-feniletilo (4)	2	Floral
Ácido octanoico (5)	50	Pesado, graso
4-Etilfenol (6)	2	Cuero, cuadra, fenólico
4-Etilguayacol	10	Fenólico, dulce
<i>t</i> -3-Hexenol	5	Herbáceo, geranio
Alcohol fenchílico	1	Humedad
Acetato de butilo	5	Frutal
Ácido 2-metilbutanoico	5	Fermentado, queso, pies
<i>m</i> -Cresol	5	Cuadra, desinfectante
2-Feniletanol	250	Floral, rosas, miel
Eugenol	1	Especiado, clavo
Vainillina	200	Dulzón, vainilla
1-Octen-3-ol	5	Setas, champiñón
Metionol	10	Repollo, verdura cocida

\* Disoluciones preparadas en etanol 6%. Números entre paréntesis se corresponden con los compuestos elegidos para el entrenamiento de las escalas en olfatometría.

La segunda fase consistió en cinco sesiones consecutivas de familiarización con la técnica olfatométrica, en la que se evaluaron disoluciones sintéticas con seis patrones representativos de los diferentes atributos aprendidos en la etapa anterior y en los rangos de concentración previstos en los extractos de sidra. Dos personas fueron desestimadas para este tipo de evaluaciones, por no adaptarse al ritmo de elución a lo largo del cromatograma (pérdida de picos, detección de picos fantasma, tendencias erráticas). Quedaron finalmente elegidas para el análisis olfatométrico ocho personas.

### 3.4.2. Verificación del grupo de jueces

La capacidad del grupo para diferenciar entre distintos niveles de estímulo se evaluó a partir de las correspondientes rectas de regresión, tomando como modelo la ley de Fechner, la cual establece que la intensidad con que se percibe un estímulo es proporcional al logaritmo de la concentración del mismo:  $I = k * \log (C)$ . Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, de acuerdo con los elevados coeficientes de correlación obtenidos, superiores a 0,93 en todos los casos.

La reproducibilidad del panel de olfatometría fue evaluada mediante el análisis de un extracto de sidra en tres sesiones diferentes. Las desviaciones estándar relativas variaron entre el 5,0% para el 2-metilbutirato de etilo, el 7,0% para los alcoholes amílicos y 2-feniletanol, y el 12,1% para el 4-etilguayacol.

### 3.4.3. Método de análisis de las muestras

Un panel de 6-8 personas llevó a cabo el análisis olfatométrico de los extractos de sidra. Cada juez evaluó los extractos una vez (entre el minuto 5 y el 40). La intensidad de cada olor fue medida utilizando una escala de 5 puntos (1: muy débil; 3: moderada; 5: muy intenso), con nueve posibles puntuaciones (se permitieron valores intermedios). Los datos considerados fueron la intensidad y la frecuencia de detección, que fueron combinadas para obtener la frecuencia modificada, FM, calculada de acuerdo a la fórmula propuesta por Dravnieks (1985):  $FM (\%) = \sqrt{F(\%) \times I(\%)}$ , donde F (%) es la frecuencia de detección, e I (%) la intensidad promedio, expresada como porcentaje de la intensidad máxima.

Entre los picos detectados, solo se tomaron en consideración aquéllos que alcanzaron una FM máxima de 30% en, al menos, una de las muestras de cada uno de los conjuntos analizados.

### 3.5. Análisis sensorial

El análisis sensorial fue llevado a cabo por ocho jueces de edades comprendidas entre 25 y 50 años, pertenecientes al Comité de Cata del Consejo Regulador de la Denominación de Origen “Sidra de Asturias”, con experiencia previa en el análisis descriptivo de sidras tradicionales. El panel se reunió con periodicidad semanal. Las muestras fueron servidas a 12 °C en copas normalizadas (AENOR, 1997). Con anterioridad a las correspondientes sesiones de evaluación de las muestras, el grupo participó en dos sesiones con el fin de familiarizarse con este producto y alcanzar un consenso sobre el vocabulario adecuado para la descripción de las sidras de nueva expresión. Se obtuvo una lista de 42 términos, de la que se eliminaron sinónimos y aquéllos que resultaban redundantes o de difícil comprensión, o los que tenían una frecuencia de citación inferior a 4.

En la Tabla 3.5.1 se muestran las definiciones de los términos finalmente elegidos, junto con las referencias desarrolladas para el entrenamiento. A la etapa de entrenamiento se dedicaron cuatro sesiones adicionales.

Las sidras se evaluaron por duplicado, sirviéndose en cada sesión un máximo de ocho copas. Se analizaron diez atributos de olor y sabor y calidades utilizando sendas escalas de nueve puntos, según se ilustra en la Figura 3.5.1.

### 3.6. Otros análisis

Complementariamente, se analizaron los parámetros enológicos de rutina en sidra utilizando métodos oficiales (Métodos UE, 1998) y/o validados en el laboratorio:

- Masa volúmica y extracto seco total: densimetría electrónica (Anton Paar DMA 5000).
- Acidez volátil: destilación por arrastre de vapor y valoración con hidróxido de sodio 0,1N.

**Tabla 3.5.1.** Referencias para la descripción de los atributos sensoriales de sidras de nueva expresión.

Atributos	Definición de consenso	Composición
Frutal	Fruta madura, manzana madura	2-Metilbutirato de etilo, 2 mg/L
Floral	Floral, rosas	2-Feniletanol, 100 mg/L
Dulzón	Dulzón, repostería	Vainillina, 200 mg/L
Lácteo	Lácteo	Acetoína, 100 mg/L + ácido 2-metilbutanoico, 5 mg/L
Especiado	Especiado	Eugenol, 1 mg/L
<i>Borras</i>	Olor/aroma de tipo azufrado que recuerda a cerillas	Sidra embotellada con sus lías al menos durante seis meses
Ácido	Sabor básico que se percibe en los laterales de la lengua	Ácido cítrico, 0,7 g/L en agua
Amargo	Sabor básico que se percibe al final de la lengua	Cafeína, 0,2 g/L en agua
Secante	Sensación táctil de sequedad en toda la superficie de la lengua y la cavidad oral	Tanino enológico (Tanicol MOX, Agrovin, Ciudad Real), 0,8 g/L en agua

Disoluciones de olores preparadas en etanol 6%.

- Acidez total: valoración ácido-base con hidróxido de sodio 0,1N y fenolftaleína como indicador.
- pH: potenciometría.
- Grado alcohólico: reflectancia en el infrarrojo cercano (Anton Paar AlcoLyzer).
- Sulfuroso total: valoración con yodo 0,02 N y almidón como indicador.
- Presión: medida afrométrica a 20 °C.
- Ácidos orgánicos: HPLC con columna de fase inversa C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm; 3 µm de tamaño de partícula) y detector de fotodiodos (Picinelli *et al.*, 2000).

## FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE SIDRA NATURAL DE NUEVA EXPRESIÓN

**NOMBRE:**

**MUESTRA:**

**FECHA:**

<b>CALIDADES</b>	Muy Deficiente				Correcta				Excelente
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>INTENSIDADES</b>	Muy Baja				Moderada				Muy Alta

<b>OLOR (1ª impresión)</b>	<b>SABOR Y SENSACIÓN EN BOCA</b>	<b>AROMA</b>	<b>OLOR (reposo)</b>
<b>CALIDAD DE OLOR</b>	<b>CALIDAD DE SABOR</b>	<b>CALIDAD DE AROMA</b>	<b>CALIDAD DE OLOR</b>
Vinagre/Acético	<b>ACIDO</b>	Vinagre/Acético	Vinagre/Acético
Frutal	<b>AMARGO</b>	Frutal	Frutal
Dulzón-vainilla	<b>SECANTE</b>	Dulzón-vainilla	Dulzón-vainilla
Especiado	<b>PERSISTENCIA DE POST-GUSTO</b>	Especiado	Especiado
Lácteo	<b>CALIDAD DE POST-GUSTO</b>	Lácteo	Lácteo
Floral		Floral	Floral
Borras		Borras	Borras

**COMENTARIOS**

<b>OLOR</b>	<b>SABOR Y SENSACIÓN EN BOCA</b>	<b>AROMA</b>	<b>OLOR (reposo)</b>

**Figura 3.5.1.** Ficha de evaluación sensorial de sidras naturales de nueva expresión.



- Azúcares y polialcoholes: HPLC con columna de intercambio catiónico y detector de índice de refracción (Blanco *et al.*, 1988).

### 3.7. Análisis estadísticos

Se utilizaron diferentes técnicas estadísticas empleando los programas SPSS v.12.0 y Unscrambler v.9.2:

- MANOVA, para evaluar la influencia de los diferentes factores considerados: procedencia y grado de maduración de sidras naturales, muestras o catadores sobre los perfiles aromáticos (cuantitativos y olfatométricos) y sensoriales.
- Análisis de varianza de medidas repetidas para establecer la influencia del tiempo de conservación y la temperatura sobre las características de las sidras de nueva expresión.
- Regresión discriminante por mínimos cuadrados parciales (D-PLS), para clasificar y establecer modelos de sidras naturales en función de su origen y grado de maduración.
- Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-1), para la construcción de modelos de atributos sensoriales a partir de datos cuantitativos u olfatométricos.
- (ANOVA) - Simultaneous Component Analysis (ASCA) para modelar la influencia de las fuentes de variación sobre los perfiles químicos, olfatométricos o sensoriales, de acuerdo con el siguiente modelo generalizado:

$$X_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

en el que  $X_{ijk}$  es el valor de cualquiera de las variables mencionadas para la sidra  $k$ , con los valores  $i, j$  de los factores  $A$  ó  $B$ ;  $\mu$  es el valor generalizado de la media;  $A_i$  es la contribución del factor  $A$  al nivel  $i$ ;  $B_j$  es la contribución del factor  $B$  al nivel  $j$ ;  $AB_{ij}$  representa la interacción entre los factores  $A$  y  $B$  a los niveles

$i, j$ , y  $\varepsilon_{ijk}$  es la variación incluida en el término de error. Se construyen cuatro matrices: una para cada factor, una para la interacción y otra para el error, y se aplica en cada una un análisis de componentes principales. En esta memoria no se comentarán las matrices correspondientes al error.



**Sidra natural tradicional:  
influencia del origen y  
estado de maduración**

**4.1. Introducción**

**4.2. Aroma de la sidra:  
origen y maduración**

4.2.1. Muestras

4.2.2. Resultados

**4.3. Tipificación de sidra  
natural**

4.3.1. Origen de las sidras

4.3.2. Maduración de las sidras



## 4.1. Introducción

En un mercado cada vez más competitivo, la trazabilidad y la identificación por el origen están adquiriendo mayor importancia. En el caso del vino, el *terroir* ha demostrado ser un elemento relevante para definir sus características. Cada región productora imparte a éste ciertos caracteres aromáticos a partir de una combinación particular de tiempo, composición del suelo, localización geográfica, variedades de uva, año de cosecha y prácticas enológicas (Coelho *et al.*, 2009; Gambetta *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2011).

El desarrollo de métodos apropiados para clasificar las bebidas según su procedencia es básico para su caracterización desde una perspectiva objetiva. El aroma es un aspecto fundamental para la definición de la calidad de una bebida, y por ende, para su aceptación o rechazo por parte del consumidor.

El empleo de perfiles aromáticos cuantitativos ha permitido discriminar vinos. Tredoux *et al.* (2008) y Weldegergis *et al.* (2011) clasificaron vinos elaborados en Sudáfrica, de acuerdo con las variedades de uva y los sistemas de envejecimiento utilizados. Por su parte, Dourtoglou *et al.* (2014) desarrollaron un método para la diferenciación de vinos varietales griegos mediante la cuantificación de siete compuestos volátiles. Rocha *et al.* (2010) asociaron el aroma de vinos blancos al perfil varietal de las uvas, en un estudio realizado en vinos experimentales a lo largo de cuatro cosechas consecutivas. Green *et al.* (2011) investigaron la influencia de la localización geográfica de la uva en la composición volátil y el perfil sensorial de los vinos Sauvignon de Nueva Zelanda, Francia y Austria. Este estudio puso de manifiesto la existencia de diferencias en las características sensoriales percibidas y en la composición química de estos vinos en función de la procedencia de la uva.

Aunque los estudios acerca de la influencia de la variedad y el origen de la uva en la composición volátil del vino son numerosos, en el caso de la manzana y la sidra son escasos. Así, se han realizado trabajos en los que se evalúan las variaciones en el perfil aromático debidas a prácticas enológicas como el tipo de prensado y a la clarificación (Mangas *et al.*, 1993; del Campo *et al.*, 2003; González Calvo, 2004). Más recientemente, Satora *et al.* (2008)

estudiaron la influencia de la variedad de manzana (Sampion, Idared y Gloster) en el perfil fenólico, la composición volátil y las características sensoriales de los denominados “vinos de manzana”. Por su parte, Haider *et al.* (2011) discriminaron entre sidras de Normandía y Bretaña en función de la concentración de acetato de isoamilo y de hexilo.

Teniendo en cuenta la importancia de establecer correctamente la tipicidad de la sidra natural tradicional, en este capítulo se aborda el estudio comparativo del aroma de sidras naturales de origen asturiano y vasco en dos etapas distintas de maduración (sidras maduras y sidras jóvenes) desde un punto de vista aromático y olfatométrico.

## **4.2. Aroma de la sidra tradicional: origen y maduración**

### **4.2.1. Muestras**

Se analizaron un total de 38 sidras tradicionales asturianas y 20 vascas, pertenecientes a dos campañas consecutivas (2011 y 2012). Cada uno de estos grupos está subdividido al 50% en “sidras maduras” y “sidras jóvenes”. Se consideran sidras jóvenes aquellas en las que el tiempo máximo transcurrido entre el mayado y el muestreo fue de seis meses.

En el caso de las sidras asturianas, el 45% de las muestras han sido elaboradas utilizando prensas verticales “de cajón” (sistema tradicional), es decir, sistemas de prensado lentos; el 25% se han obtenido utilizando prensas horizontales neumáticas (prensado rápido), y el 30% restante son mezcla de los dos tipos de prensa.

Por su parte, las sidras vascas han sido elaboradas en su mayoría utilizando prensas horizontales neumáticas.

### **4.2.2. Resultados**

#### ***Parámetros enológicos***

En la Tabla 4.2.1 se resumen los parámetros enológicos de las muestras estudiadas. El análisis de varianza efectuado pone de manifiesto una

**Tabla 4.2.1.** Parámetros enológicos de las sidras estudiadas.

	Significación			SIDRAS ASTURIANAS								SIDRAS VASCAS							
				JÓVENES				MADURAS				JÓVENES				MADURAS			
	Int.	Proc.	Mad.	Media	DS	Máx.	Mín.	Media	DS	Máx.	Mín.	Media	DS	Máx.	Mín.	Media	DS	Máx.	Mín.
Grado alcohólico (% v/v)	ns	ns	ns	6,83	0,43	7,46	5,57	6,61	0,16	6,92	6,38	6,62	0,25	7,08	6,23	6,56	0,35	7,12	6,09
pH	ns	***	***	3,82	0,08	3,93	3,60	3,87	0,07	3,97	3,72	3,68	0,08	3,81	3,55	3,77	0,06	3,87	3,67
Acidez volátil (g ác. acético/L)	ns	*	***	0,98	0,53	1,88	0,19	2,24	0,46	2,90	1,32	0,94	0,35	1,28	0,27	1,81	0,55	2,83	1,06
Acidez total (g ác. sulfúrico/L)	ns	ns	***	3,25	0,46	3,82	2,18	3,93	0,39	4,78	3,19	3,45	0,21	3,84	3,14	3,99	0,47	4,99	3,40
Ácido láctico (g/L)	ns	ns	ns	4,8	0,9	7,9	3,7	4,5	0,7	6,6	3,3	4,8	0,6	5,7	4,2	4,9	0,7	6,0	3,6
Fructosa (g/L)	ns	***	***	1,0	0,6	2,0	0,3	nd				3,2	2,7	6,6	0,5	0,7	0,5	1,4	0,2
Glicerina (g/L)	**	ns	***	3,1	1,2	5,3	0,1	1,5	1,1	3,7	0,1	3,5	1,0	4,6	1,4	1,7	0,9	3,3	0,4
Sorbitol (g/L)	**	***	ns	7,1	1,7	11,6	4,2	5,8	0,7	7,1	4,6	5,6	0,9	7,6	4,8	5,0	1,2	7,5	3,6

(\*\*\*): significativo al 1%; (\*\*): significativo al 5%; (\*): significativo al 10%; ns: no significativo; Int.: Interacción; Proc: procedencia; Mad: maduración; DS: desviación estándar; Máx: máximo; Min: mínimo; nd: no detectado.



interacción significativa (procedencia x maduración) para los parámetros glicerina y sorbitol.

Los ácidos láctico y acético son constituyentes importantes de la sidra. El ácido málico, principal ácido en la manzana, se convierte en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas, siendo los contenidos al final de la fermentación inferiores a 0,5 g/L (datos no mostrados).

Entre los azúcares, se observan concentraciones residuales de fructosa (< 1 g/L) en la práctica totalidad de las muestras, con excepción de una sidra vasca joven, que presentó un valor superior a 6 g/L. El contenido de fructosa varió significativamente en función tanto del origen como de la maduración.

### ***Perfil cuantitativo de las sidras***

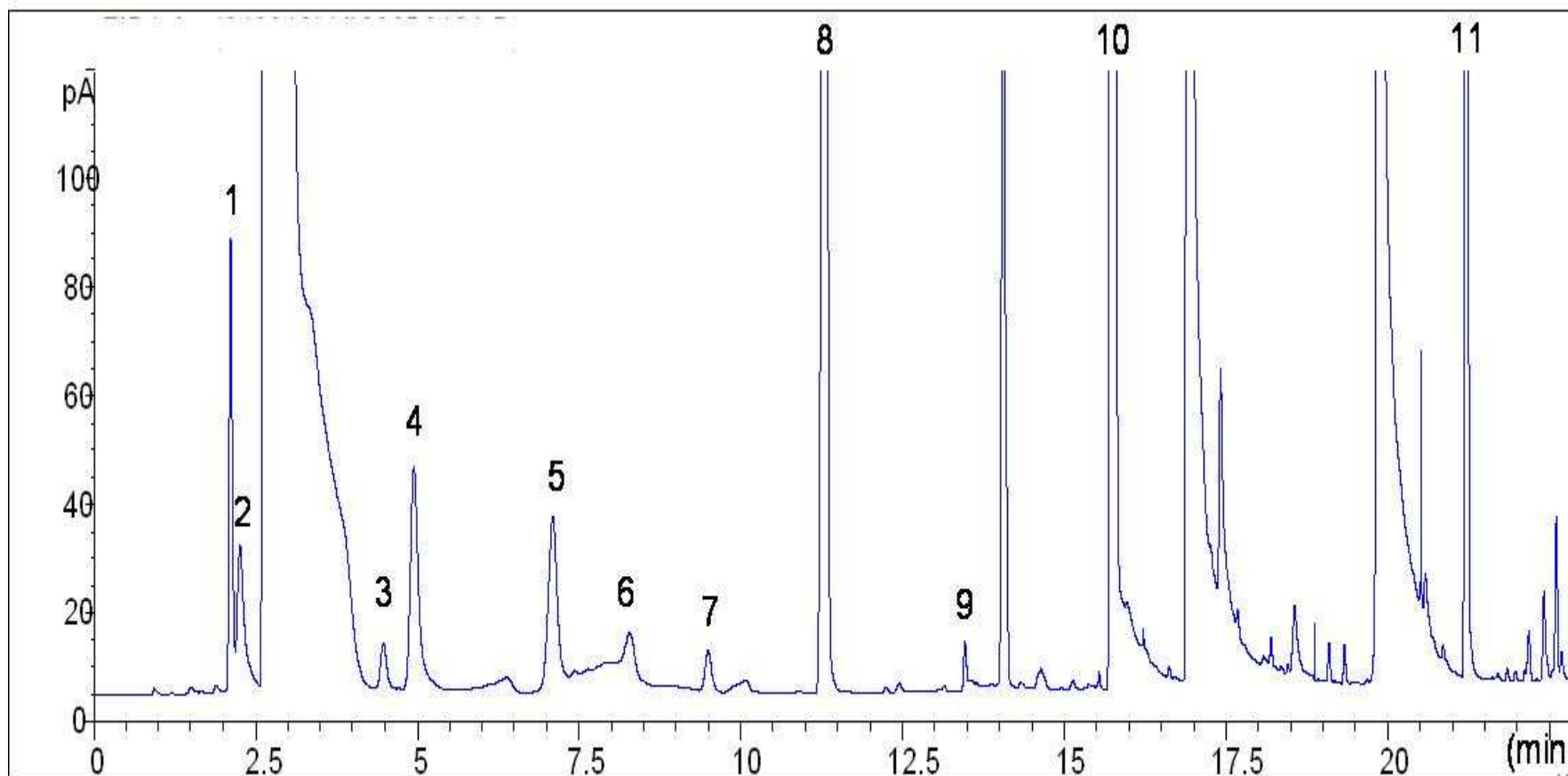
En las Figuras 4.2.1 y 4.2.2 se presentan, a modo de ejemplo, cromatogramas de la fracción mayoritaria y minoritaria obtenidos por CG/FID.

Los resultados obtenidos en el análisis de los compuestos volátiles se resumen en la Tabla 4.2.2.

Parte de la fracción volátil mayoritaria se ve significativamente afectada por el origen de la sidra (acetato de etilo, 2-butanol, *i*-butanol, alcohol alílico, 1-butanol, alcoholes amílicos y 2-feniletanol). Todos estos componentes se observaron en mayor concentración en las sidras asturianas, excepto el 1-butanol.

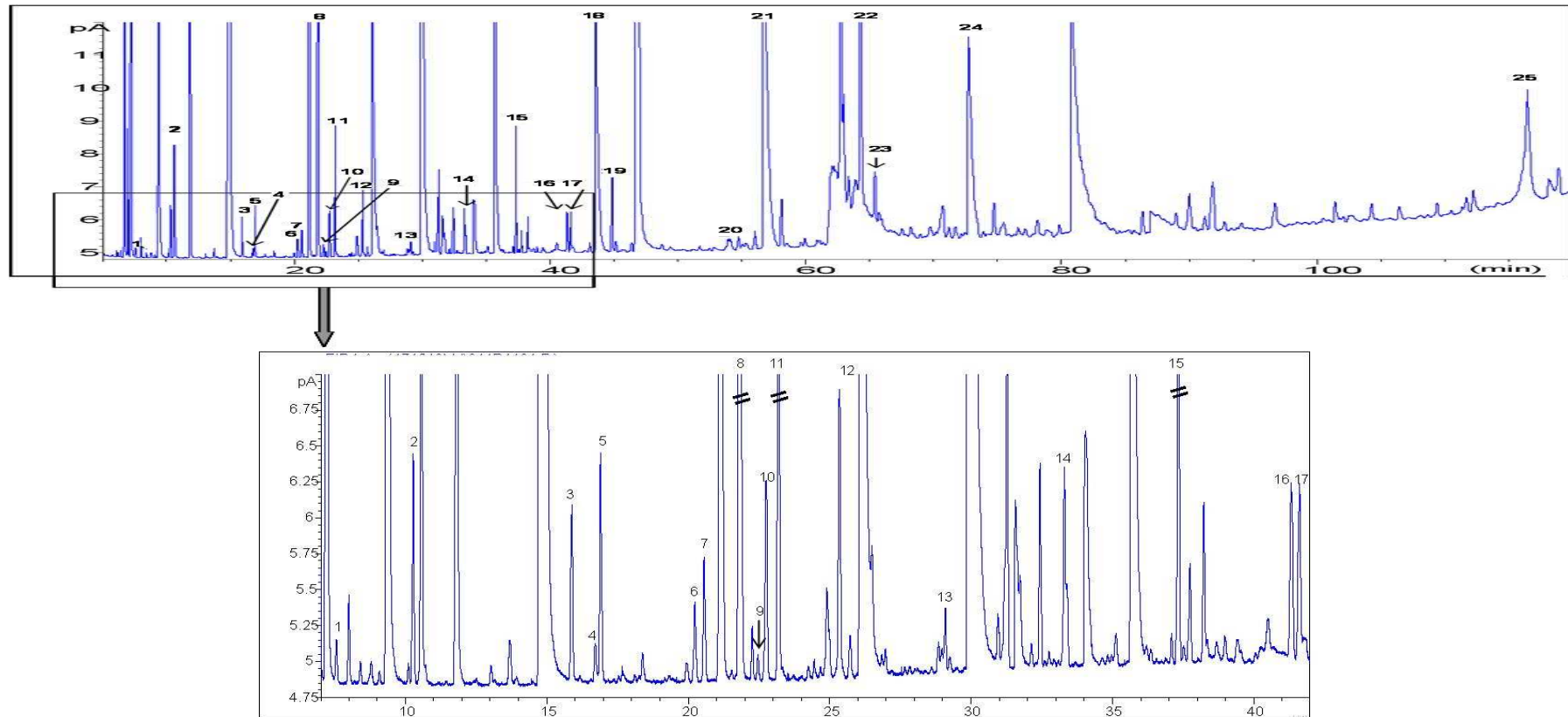
En la fracción volátil minoritaria las principales familias fueron ácidos grasos, fenoles volátiles y alcoholes. Se observaron interacciones significativas entre la procedencia y la maduración en el caso del ácido hexanoico, 3-metil-2-butenol, 1-pentanol, 3-metil-3-butenol, 2-metilbutirato de etilo y acetato de propilo.

Los ácidos grasos representaron en torno al 30% de esta fracción aromática. El ácido octanoico fue el mayoritario, tanto en las sidras asturianas como en las vascas, seguido por el hexanoico y el decanoico.



**Figura 4.2.1.** Compuestos volátiles mayoritarios en sidra natural tradicional.

1: acetato de etilo; 2: metanol; 3: 2-butanol; 4: 1-propanol; 5: *i*-butanol; 6: alcohol alílico; 7: 1-butanol; 8: alcoholes amílicos; 9: acetoína; 10: lactato de etilo; 11: 2-feniletanol.



**Figura 4.2.2.** Cromatograma típico de un extracto de sidra natural.

1: 2-metilbutirato de etilo; 2: acetato de isoamilo; 3: hexanoato de etilo; 4: 3-metil-3-butenol; 5: 1-pentanol; 6: 3-metil-2-butenol; 7: 3-metil-1-pentanol; 8: hexanol; 9: *t*-3-hexenol; 10: 3-etoxi-1-propanol; 11: *c*-3-hexenol; 12: octanoato de etilo; 13: 3-hidroxi-2-butenol; 14:  $\gamma$ -butirolactona; 15: metionol; 16: 4-hidroxi-2-butenol; 17: acetato de 2-feniletilo; 18: ácido hexanoico; 19: alcohol bencílico; 20: 4-etilguayacol; 21: ácido octanoico; 22: 4-etilfenol; 23: 4-vinilguayacol; 24: ácido decanoico; 25: 4-etilcatecol.

**Tabla 4.2.2.** Composición volátil de las sidras analizadas en función de su procedencia y estado de maduración.

	Significación			SIDRAS ASTURIANAS								SIDRAS VASCAS								
				JÓVENES				MADURAS				JÓVENES				MADURAS				
	Int.	Proc.	Mad.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>																				
Acetaldehído	ns	ns	***	1	1	6	nd	4	6	17	nd	nd					2	4	12	nd
Acetato de etilo	ns	***	***	46	25	102	18	93	35	172	38	30	10	48	17	67	21	97	30	
Metanol	ns	ns	***	36	16	69	5	81	41	214	33	37	14	58	19	63	11	80	49	
2-Butanol	ns	*	***	3	6	22	nd	18	15	55	nd	1	1	3	nd	9	8	29	1	
1-Propanol	ns	ns	***	12	10	42	2	42	20	77	9	7	3	10	3	47	30	115	15	
<i>i</i> -Butanol	ns	*	ns	37	18	90	11	39	8	62	24	26	7	38	15	37	19	82	15	
Alcohol alílico	ns	*	**	4	6	20	nd	9	7	30	nd	nd		2	nd	7	9	27	1	
1-Butanol	ns	***	ns	4	1	6	2	5	1	7	4	6	2	10	3	6	1	8	4	
Alcoholes amílicos <sup>a</sup>	ns	**	**	171	48	283	95	193	32	248	125	122	24	176	102	179	68	362	125	
Acetoína	ns	ns	ns	3	2	12	nd	3	2	7	nd	2	1	5	nd	3	1	5	nd	
Lactato de etilo	ns	ns	***	113	56	226	43	192	42	284	111	122	45	168	38	218	35	294	171	
2-Feniletanol	ns	***	ns	93	52	200	15	95	38	178	35	42	33	123	15	62	50	181	26	
<b>Volátiles minoritarios (µg/L)</b>																				
<b>Ácidos grasos</b>																				
Hexanoico	**	**	***	2.638	859	5.783	1.609	3.802	1.762	9.416	2.239	2.711	888	4.395	1.572	4.477	1.234	6.840	2.437	
Octanoico	ns	ns	ns	4.344	1.624	8.752	2.361	4.824	2.982	13.727	2.367	3.409	1.021	5.106	2.028	5.241	1.882	8.455	2.991	
Decanoico	ns	ns	ns	2.297	709	3.619	1.182	2.066	1.352	5.947	916	1.717	672	2.795	452	1.793	514	2.731	970	

Tabla 4.2.2. (Cont.)

	Significación			SIDRAS ASTURIANAS								SIDRAS VASCAS							
				JÓVENES				MADURAS				JÓVENES				MADURAS			
	Int.	Proc.	Mad.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.
<b>Fenoles Volátiles</b>																			
4-Etilguayacol	ns	ns	ns	582	282	1.036	< LC	809	496	2.688	353	639	352	1.304	< LC	533	290	942	87
4-Etilfenol	ns	ns	ns	1.972	574	3.080	1.105	2.774	1.481	8.165	1.743	2.243	1.020	4.819	904	2.310	416	3.281	1.848
4-Vinilguayacol	ns	***	***	2.221	842	3.922	920	834	214	1.509	450	1.121	544	1.967	232	nd	nd	nd	nd
4-Etilcatecol	ns	ns	***	2.643	2.094	9.711	286	5.167	2.158	8.713	1.256	2.276	1.896	5.891	< LC	5.506	1.972	9.195	2.130
<b>Alcoholes</b>																			
3-Metil-3-butenol	**	ns	***	26	7	39	< LC	47	18	95	29	27	12	44	< LC	31	8	46	< LC
1-Pentanol	***	ns	***	70	16	94	42	145	63	334	84	93	41	155	36	109	19	138	81
3-Metil-2-butenol	**	**	***	32	14	62	10	79	54	291	42	33	16	59	9	45	13	76	25
3-Metil-1-pentanol	ns	ns	ns	35	19	80	14	49	29	140	24	28	11	46	12	33	15	60	20
Hexanol	ns	ns	***	3.798	624	5.120	2.774	5.853	2.713	13.646	3.817	4.030	1.154	5.540	1.908	4.969	763	6.283	4.110
<i>t</i> -3-Hexenol	ns	***	***	26	6	45	16	40	23	109	23	21	6	32	11	27	8	39	17
<i>c</i> -3-Hexenol	ns	***	*	173	71	312	69	242	122	505	88	101	42	196	61	142	65	255	68
Bencílico	ns	***	***	200	112	414	24	398	179	863	195	141	103	304	< LC	229	86	375	93
<b>Ésteres de etilo</b>																			
Propionato	ns	ns	***	209	142	550	57	1.898	1.062	4.567	518	190	130	467	71	1.424	1.556	5.529	130
Butirato	ns	ns	***	116	49	279	57	168	52	277	97	115	37	178	56	160	44	243	102
2-Metilbutirato	***	ns	***	22	8	45	6	47	16	85	24	35	11	47	16	30	19	63	12
Hexanoato	ns	ns	*	147	58	309	51	195	83	398	98	143	54	244	50	177	65	266	81
Octanoato	ns	*	ns	207	88	414	80	228	116	479	92	158	31	216	115	177	75	315	86
3-Hidroxibutirato	ns	ns	ns	126	100	403	28	180	87	414	81	148	56	256	55	148	89	349	65
4-Hidroxibutirato <sup>b</sup>	ns	***	ns	799	277	1.424	419	855	454	2.381	414	522	208	1.001	200	594	282	1.116	266

Tabla 4.2.2. (Cont.)

	Significación			SIDRAS ASTURIANAS								SIDRAS VASCAS							
				JÓVENES				MADURAS				JÓVENES				MADURAS			
	Int.	Proc.	Mad.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.	Media	DS	Max.	Min.
<b>Acetatos</b>																			
Propilo	***	***	***	28	11	57	16	142	69	341	62	31	6	42	23	51	20	101	31
Butilo	ns	ns	ns	52	19	83	5	46	5	53	37	48	18	89	33	43	3	47	38
Isoamilo	ns	***	ns	619	447	1.944	82	470	253	1.159	150	183	119	468	45	243	125	480	139
2-Feniletilo	ns	**	ns	282	367	1.584	< LC	104	71	285	27	42	26	95	< LC	48	44	130	< LC
<b>Otros</b>																			
3-Etoxi-1-propanol	ns	*	***	218	192	735	< LC	372	258	1.128	119	69	46	179	< LC	285	282	809	< LC
$\gamma$ -Butirolactona	ns	***	***	512	200	957	188	2.008	776	4.362	1.039	1.137	596	2.299	398	2.641	1.771	7.077	1.058
Metionol	ns	ns	**	448	219	1.066	220	639	296	1.599	289	488	123	669	247	622	282	1.221	312

(a): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (b): cuantificado como 3-hidroxibutirato de etilo; ns: no significativo; (\*\*\*): significativo al 1%; (\*\*): significativo al 5%; (\*): significativo al 10%; DS: desviación estándar; nd: no detectado; LC: límite de cuantificación; Int: Interacción; Proc: procedencia; Mad: maduración; Máx: máximo; Mín: mínimo.

Los fenoles volátiles y los alcoholes contribuyen a la fracción aromática con porcentajes elevados (26% y 20%, respectivamente). Entre los fenoles se han analizado el 4-etilguayacol (4-EG), el 4-etilfenol (4-EF), el 4-vinilguayacol (4-VG) y el 4-etilcatecol (4-EC). El fenol volátil más abundante fue el 4-EC, con concentraciones promedio en torno a 2 mg/L en las sidras jóvenes y 5 mg/L en las maduras. Por el contrario, el 4-EG fue el minoritario, con concentraciones promedio cercanas a 600 µg/L. Se observaron diferencias significativas en función del origen únicamente en el caso del 4-VG, que alcanzó valores de concentración inferiores en las sidras vascas, no detectándose en las sidras maduras.

Entre los alcoholes analizados, el hexanol fue el más importante, con una concentración promedio próxima a 4 mg/L. El origen de la sidra afectó a los contenidos de *t*-3-hexenol, *c*-3-hexenol y alcohol bencílico, siendo significativamente inferiores en las sidras de origen vasco.

Los ésteres de etilo y acetatos representaron aproximadamente el 10% de la fracción minoritaria analizada. El propionato y el 4-hidroxibutirato de etilo alcanzaron las concentraciones más altas, mientras que el acetato de isoamilo fue el éster mayoritario entre los acetatos analizados (Tabla 4.2.2). El 4-hidroxibutirato de etilo, el octanoato de etilo y los acetatos de isoamilo y 2-feniletilo aportaron diferencias significativas entre las sidras en función de su origen, encontrándose niveles significativamente superiores en las sidras asturianas.

Otros compuestos analizados fueron el 3-etoxi-1-propanol, la  $\gamma$ -butirolactona y el metionol (Tabla 4.2.2). El 3-etoxi-1-propanol estuvo presente en mayor concentración en las sidras asturianas, a diferencia de la  $\gamma$ -butirolactona. El metionol se detectó en todos los tipos de sidra analizados en concentraciones en torno a los 500 µg/L en ambas poblaciones de sidras.

La maduración de la sidra, que de manera opcional puede realizarse en contacto con *borras*, influye notablemente en las características sensoriales de la sidra.

En cuanto a los volátiles mayoritarios, todos excepto *iso*-butanol, 1-butanol, acetoína y 2-feniletanol experimentaron un aumento muy significativo de la concentración en las sidras maduras.

Entre los volátiles minoritarios, los alcoholes (hexanol, *t*-3-hexenol, *c*-3-hexenol y bencílico), los ésteres de etilo (propionato, butirato y hexanoato) y los fenoles volátiles (4-VG y 4-EC) fueron los componentes más afectados, junto con el 3-etoxi-1-propanol, la  $\gamma$ -butirolactona y el metionol. Todos ellos, excepto el 4-VG presentaron concentraciones superiores en las sidras maduras.

### ***Perfil olfatométrico de las sidras***

Los resultados del estudio olfatométrico de las sidras analizadas se muestran en la Tabla 4.2.3. Se han establecido de manera convencional dos grupos atendiendo a la FM (%) media.

El primer grupo está integrado por aquellos odorantes que alcanzan un valor promedio de  $FM \geq 50\%$  en alguna de las categorías analizadas. Está formado por 24 compuestos, detectados en todas las sidras, la mayoría de ellos con frecuencias modificadas elevadas. Entre estos odorantes se encuentran diferentes productos de la fermentación (alcoholes amílicos, 2-feniletanol, ácidos grasos) y fenoles volátiles. Los valores promedio más altos de FM correspondieron al 4-EG (83%) y el sotolón (81%) en las sidras maduras. Ninguno de los compuestos incluidos en este grupo aporta diferencias significativas en lo referente a la procedencia de la sidra.

En un segundo grupo ( $FM \leq 50\%$ ) se clasifican 33 odorantes, en este caso con valores de FM promedio hasta 47%. La mayoría de los compuestos incluidos en este grupo no se perciben en alguna de las muestras, aunque algunos alcanzan valores máximos de frecuencia modificada elevados.

El lugar de elaboración de la sidra afectó de manera significativa a cuatro de los compuestos incluidos en este grupo (octanoato de etilo, IRL 1477, 4-hidroxi-butirato de etilo, e isoeugenol). En el caso del octanoato de etilo y del 4-hidroxi-butirato de etilo, los valores de frecuencia modificada encontrados en



**Tabla 4.2.3.** Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas: descripción olfativa, identificación, frecuencias modificadas promedio, máxima y mínima y resultados de significación para los diferentes factores (procedencia y maduración).

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	RefV.	Significación			SIDRAS ASTURIANAS						SIDRAS VASCAS					
					Int	Proc.	Mad.	JÓVENES			MADURAS			JÓVENES			MADURAS		
								M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.
<i>FM promedio ≥ 50% en alguna de las sidras</i>																			
931	721	Frutal	Acetato de propilo	v2	ns	ns	ns	51	67	30	52	73	29	14	22	7	51	67	15
1074	805	Frutal, dulce, manzana	2-Metilbutirato de etilo	v5	ns	ns	ns	62	74	46	64	79	42	66	72	56	63	72	46
1217	753	Tipo alcoholes superiores	Alcoholes amílicos	v8	ns	ns	ns	64	77	48	61	77	45	58	71	38	63	74	53
1294	983	Setas	1-Octen-3-ona	v12	ns	ns	***	35	73	7	72	82	53	15	26	7	71	77	59
1299	805	Ahumado, tostado	3-Metil-2-butenol	v13	ns	ns	***	58	75	7	22	37	7	72	76	60	14	24	7
1383	887	Floral, geranio	l-3-Hexenol	v16	***	ns	***	47	68	7	56	83	24	41	59	22	54	75	33
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Ácido acético	v22	ns	ns	***	59	75	32	68	77	55	56	66	41	66	75	58
1529	909	Graso, pesado	Ácido l-butanoico	v30	***	ns	***	20	51	7	46	79	18	19	30	7	50	73	7
1635	954	Rancio, barniz	γ-Butirolactona	v34	ns	ns	ns	72	82	59	73	83	60	70	80	58	76	81	71
1681		Queso, rancio	Ácido 2-metilbutanoico	v36	ns	ns	ns	76	85	55	76	87	62	71	80	60	77	83	68
1735	1013	Vegetales cocidos, azufrado	Metionol	v38	ns	ns	***	68	77	48	54	72	22	67	73	46	55	62	46
1837	1267	Compota, floral	Acetato de 2-feniletilo	v43	ns	ns	ns	71	81	48	69	81	52	71	79	57	72	80	55
1860	1174	Graso, establo	Ácido hexanoico	v44	ns	ns	***	64	81	46	71	86	24	61	73	42	74	83	60
1929	1175	Rosas	2-Feniletanol	v47	ns	ns	ns	77	89	54	80	88	73	75	80	62	77	83	61
2047	1294	Dulce, especiado	4-Etilguayacol	v52	ns	ns	ns	76	88	43	79	89	51	74	84	65	83	90	79
2078	1358	Graso, establo, especiado	Ácido octanoico	v54	ns	ns	***	26	72	15	63	80	24	27	45	13	62	81	18
2079		Dulce, especiado	ni	v55	ns	ns	ns	62	83	18	37	60	11	16	28	7	50	72	35
2100	1123	Cuero, establo	p-Cresol	v57	ns	ns	ns	41	79	7	48	73	21	68	76	53	48	70	32
2171	1476	Especiado, dulce, establo	γ-Decalactona	v62	ns	ns	ns	39	67	7	50	77	21	46	69	7	38	67	18
2183	1385	Especiado, clavo	Eugenol	v63	ns	ns	***	29	47	7	51	85	24	39	66	7	48	65	24
2194	1165	Cuero, establo	4-Etilfenol	v64	ns	ns	ns	70	85	49	70	86	47	72	81	61	74	82	61

Tabla 4.2.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	RefV.	Significación			SIDRAS ASTURIANAS						SIDRAS VASCAS					
								JÓVENES			MADURAS			JÓVENES			MADURAS		
					Int	Proc.	Mad.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.
2210	1095	Ahumado, especiado, curry	Sotolón	v66	ns	ns	ns	77	88	54	80	88	69	77	83	70	81	88	74
2246	1279	Ahumado, especiado	4-Vinilguayacol	v68	ns	ns	ns	52	73	7	41	63	21	44	67	18	50	65	37
2285	1451	Graso, establo	Ácido decanoico	v71	ns	ns	ns	71	83	31	66	84	11	71	81	51	68	82	45
<i>FM promedio &lt; 50% en alguna de las sidras</i>																			
905	719	Frutal	Propionato de etilo	v1	ns	ns	ns	15	34	0	19	43	0	48	62	22	28	65	0
1057	804	Frutal	Butirato de etilo	v4	ns	ns	ns	41	66	9	37	62	22	38	62	15	43	56	30
1144	879	Frutal, plátano	Acetato de isoamilo	v7	ns	ns	ns	27	57	0	22	42	0	16	24	0	20	24	0
1240	1183	Fruta madura	Hexanoato de etilo	v10	ns	ns	ns	46	63	30	44	65	0	41	54	22	45	66	30
1364	889	Floral, frutal	Hexanol	v15	ns	ns	ns	20	35	0	22	65	0	0	0	0	16	33	0
1404	867	Floral, dulce	c-3-Hexenol	v17	ns	ns	**	21	44	0	25	47	0	13	30	0	34	71	0
1419		Dulce, especiado	ni	v19	ns	ns	ns	25	63	0	0	0	0	11	18	0	16	22	0
1440	1190	Frutal, hierba, resinoso	Octanoato de etilo	v21	ns	***	ns	17	37	0	17	50	0	13	29	0	12	26	0
1466	908	Polvo, rancio, vegetales cocidos	Metional	v23	**	ns	***	21	54	0	36	63	7	26	37	0	22	39	0
1477		Especiado, verdura cocida	ni	v24	ns	***	***	24	61	0	38	57	9	0	0	0	39	54	0
1494	957	Frutal, floral	3-Hidroxibutirato de etilo	v27	ns	ns	***	17	39	0	41	68	0	26	33	0	41	65	0
1508		Graso, frutal	ni	v28	ns	ns	ns	29	63	7	0	0	0	23	26	0	7	7	0
1519	856	Graso, establo	Ácido propanoico	v29	ns	ns	***	14	49	0	41	67	11	26	37	0	45	58	34
1554	1096	Graso, resinoso	1-Octanol	v32	ns	ns	ns	23	47	0	22	42	0	20	36	7	22	51	0
1567	966	Lácteo, queso azul	Ácido butanoico	v33	***	ns	***	26	44	0	0	0	0	10	15	0	16	39	0
1768		Caldoso	ni	v40	ns	ns	ns	38	66	0	32	55	7	20	55	0	40	50	22
1775		Floral, frutal, coco	ni	v41	***	***	***	18	41	0	29	55	0	14	27	0	7	7	0
1801		Dulce, floral	4-Hidroxibutirato de etilo <sup>a</sup>	v42	ns	***	ns	30	59	0	29	55	0	11	9	0	15	39	0
1880	1118	Ahumado, dulce, especiado	Guayacol	v45	ns	ns	ns	26	63	0	29	54	0	25	47	0	31	46	0

Tabla 4.2.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	RefV.	Significación			SIDRAS ASTURIANAS						SIDRAS VASCAS					
					Int	Proc.	Mad.	JÓVENES			MADURAS			JÓVENES			MADURAS		
								M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.	M	Máx.	Mín.
1903	1071	Floral, frutal, dulce	Alcohol bencílico	v46	ns	ns	ns	36	66	9	33	58	14	33	49	0	37	62	18
1986		Floral, especiado	ni	v49	**	**	**	14	44	0	22	66	0	21	41	0	15	33	0
2001	1088	Ahumado	<i>o</i> -Cresol	v50	ns	ns	ns	26	63	0	20	43	0	20	49	0	22	41	7
2023		Graso, especiado	ni	v51	**	ns	***	18	25	0	28	59	0	21	38	0	20	41	0
2109	1099	Cuero, establo	<i>m</i> -Cresol	v58	ns	ns	***	44	68	0	22	53	9	47	66	26	21	47	0
2143		Dulce, especiado	ni	v59	ns	ns	ns	16	33	0	18	45	0	27	51	0	10	11	0
2169		Floral, dulce	ni	v61	*	ns	***	37	61	0	27	53	0	42	63	0	16	29	0
2244		Especiado, ahumado	ni	v67	**	***	ns	20	32	0	20	34	11	26	45	13	30	48	0
2252		Especiado, dulce	ni	v69	ns	ns	ns	0	0	0	24	61	7	15	26	0	14	21	0
2261	1913	Resinoso, hierba seca	Hexadecanoato de etilo	v70	ns	ns	ns	20	45	0	33	77	11	31	71	0	23	39	0
2297		Establo, fenólico	ni	v72	*	ns	***	20	27	0	36	75	9	36	68	0	28	37	0
2333		Establo, fenólico	ni	v75	ns	ns	ns	13	24	0	24	52	7	15	24	0	30	58	7
2358		Cuadra, floral	ni	v76	ns	ns	ns	18	39	0	13	29	0	11	18	0	21	42	0
2360	1496	Ahumado, fenólico	Isoeugenol	v77	ns	***	ns	22	32	0	12	29	0	15	37	0	25	51	0

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; RefV: referencia de las variables; Int: interacción; ni: no identificado; (\*\*): significativo al 1%; (\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 10%; ns: no significativo; Proc: procedencia; Mad: maduración; M: media; Máx: máximo; Mín: mínimo; a: tentativamente identificado.

las sidras asturianas fueron significativamente superiores, en concordancia con una mayor concentración de estos compuestos (Tabla 4.2.2)

El resto de los picos mostraron diferentes comportamientos. El compuesto con IRL 1477, descrito como especiado, verdura cocida, se detectó en ambas sidras maduras con FM similares, mientras que en las sidras jóvenes aparecen diferencias: no es detectado en las sidras vascas, mientras que en las asturianas se percibe, aunque con una frecuencia modificada baja (24%).

La maduración afectó significativamente al perfil olfatométrico de las sidras. De manera general, se produce un incremento de las intensidades de detección en las sidras maduras, excepto 3-metil-2-butenol, metionol, y *m*-cresol, que disminuyen (Tabla 4.2.3).

Entre los odorantes con FM  $\geq 50\%$ , la maduración afecta a siete compuestos. En este grupo se han cuantificado los ácidos hexanoico y octanoico, 3-metil-2-butenol y metionol. Los dos primeros muestran tendencias de variación olfatométrica coherentes con las observadas a nivel cuantitativo, mientras que el metionol presenta un comportamiento diferente (Tabla 4.2.2).

Entre los odorantes incluidos en el segundo grupo, solo han sido cuantificados el *c*-3-hexenol y el 3-hidroxi-butirato de etilo, observándose la misma tendencia en el análisis olfatométrico y en el cuantitativo, es decir, un aumento de concentraciones e intensidades de percepción.

### 4.3. Tipificación de la sidra natural

Se ha llevado a cabo un análisis de regresión discriminante por mínimos cuadrados (D-PLS), definiendo una variable respuesta de carácter binario, Y (Origen ó Maduración). Las variables predictoras fueron olfatométricas (n= 77) y químicas cuantitativas (n= 51), incluyendo aromas, parámetros globales, ácidos orgánicos y polialcoholes.

Como etapa previa al análisis de regresión, las variables fueron centradas y se eliminaron seis variables olfatométricas por tener varianza igual

a cero. La matriz de datos final tuvo una dimensión (filas x columnas) de 58 (observaciones) x 123 (variables).

La variable respuesta se definió, en función de la fuente de variación, del modo siguiente:

- PLS-Origen: Y= 0 (procedencia Asturias, n= 38), ó Y= 1 (procedencia País Vasco, n= 20).
- PLS-Maduración: Y= 0 (sidras maduras, n= 28), ó Y= 1 (sidras jóvenes, n= 30), categorizadas en función del tiempo transcurrido desde el mayado, como se describe en el apartado 4.2.1.

Los modelos discriminantes fueron verificados por validación cruzada con tres grupos de cancelación, asignando de modo aleatorio 19 muestras en cada grupo.

#### 4.3.1. Origen de las sidras

La utilización de las variables químicas no proporcionó resultados satisfactorios en la construcción de modelos de predicción según el origen, por lo que solo se trabajó con las variables olfatométricas. El modelo lineal obtenido con estas últimas se resume en la Tabla 4.3.1.

**Tabla 4.3.1.** Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función del origen.

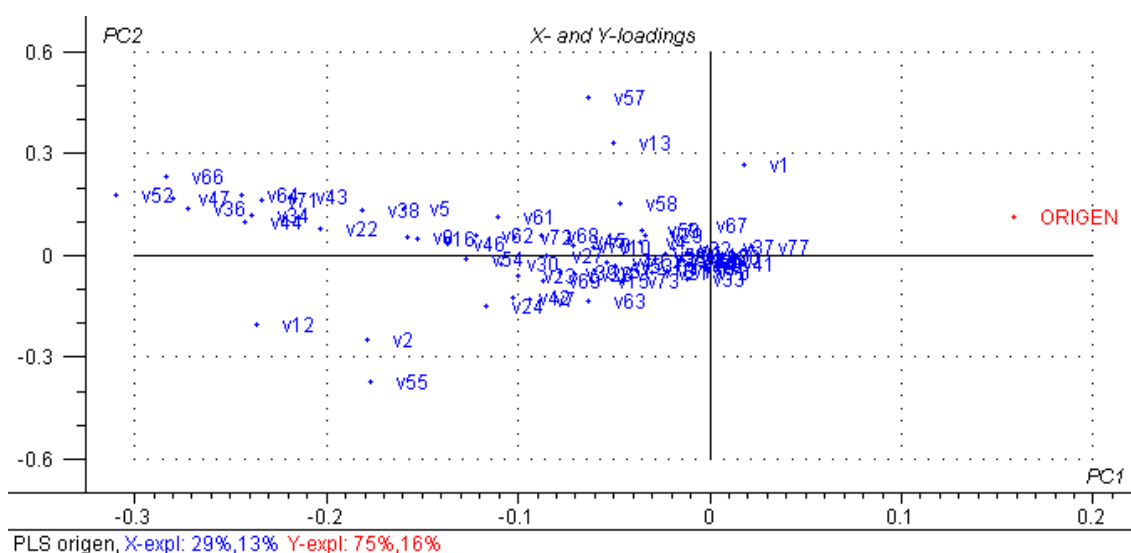
	Calibración	Predicción
Pendiente (m)	0,91	0,88
Coeficiente de correlación (R)	0,95	0,94
Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0,90	0,88
Error estándar	SEC = 0,14	SEP = 0,17

SEC: error estándar de calibración; SEP: error estándar de predicción

Como se puede observar, el modelo de regresión explica el 88% de la varianza del origen, con un error de predicción de 0,17. La relación entre los errores de calibración y de predicción fue de 1,21, por lo que cabe considerar que el modelo está correctamente validado, si tenemos en cuenta el criterio de

no alcanzar una ratio máxima (SEP/SEC) de 1,33. Es decir, el error de predicción no puede superar en más de un 33% al error de calibración.

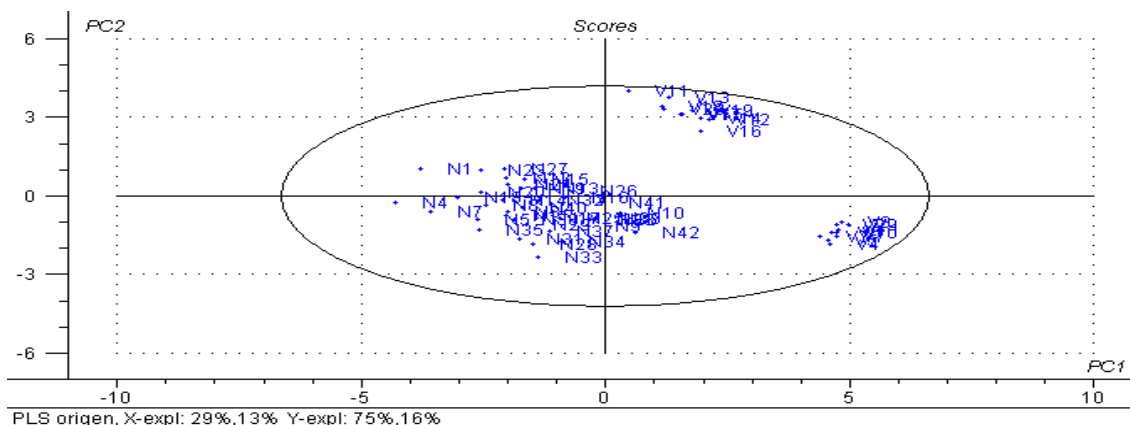
En la Figura 4.3.1 se representan los pesos (*loadings*) de las variables predictoras sobre el plano formado por las dos primeras componentes, que en conjunto explican el 42% de la varianza.



**Figura 4.3.1.** Proyección de las variables olfatométricas sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Referencia de las variables, ver Tabla 4.2.3.

Las variables más correlacionadas con la CP1 (v2, v12, v36, v47, v52, v66, correspondientes a acetato de propilo, 1-octen-3-ona, ácido 2-metilbutanoico, 2-feniletanol, 4-EG y sotolón), permiten discriminar las sidras según su procedencia, mientras que las variables más correlacionadas con la CP2 (v1, v13 y v57, correspondientes a propionato de etilo, 3-metil-2-butenol y *p*-cresol), separan las muestras vascas según su madurez.

En la Figura 4.3.2. se proyectan los valores (*scores*) de las distintas observaciones. En esta figura se recoge también la elipse de la  $T^2$  de Hotelling al 95% de confianza, no detectándose *outliers* en este conjunto de muestras.



**Figura 4.3.2.** Proyección de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales. N: Asturias; V: País Vasco.

Como se puede apreciar, el primer eje permite separar las sidras por su lugar de origen, y además, la segunda componente principal establece diferencias entre las sidras vascas por su nivel de maduración.

#### 4.3.2. Maduración de las sidras

Una primera estimación de posible relación lineal entre las variables predictoras con la variable binaria  $Y_{\text{maduración}}$  nos ha permitido concluir que solo los perfiles aromáticos (olfatométricos y cuantitativos) presentaban buenas correlaciones con el factor maduración, por lo que no se han tenido en cuenta los parámetros globales, los ácidos orgánicos, ni los polialcoholes.

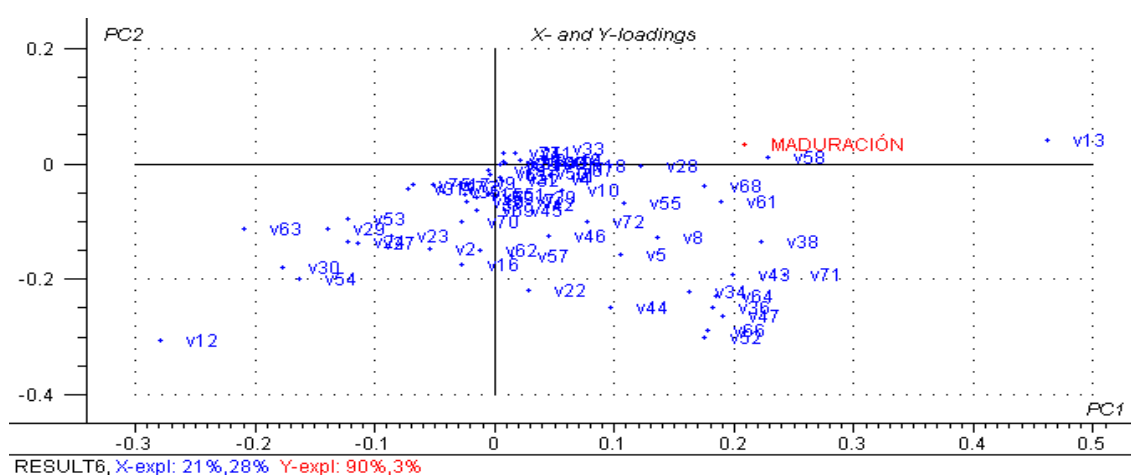
El modelo discriminante obtenido utilizando las variables olfatométricas se resume en la Tabla 4.3.2. Este modelo matemático es capaz de explicar el 92% de la varianza observada, con un error de predicción de 0,15 que supera al error de calibración (0,13) en solo un 15%, por lo que podemos considerar que el modelo está correctamente validado.

**Tabla 4.3.2.** Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función de la madurez, obtenidos a partir de las variables olfatométricas.

	Calibración	Predicción
Pendiente (m)	0,93	0,88
Coeficiente de correlación (R)	0,97	0,96
Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	0,94	0,92
Error estándar	SEC = 0,13	SEP = 0,15

SEC: error estándar de calibración; SEP: error estándar de predicción

La representación de los pesos de las variables olfatométricas sobre el plano de las dos primeras componentes principales nos permite identificar qué odorantes son relevantes en la construcción del modelo discriminante (Figura 4.3.3). Los odorantes v12 y v13 (1-octen-3-ona y 3-metil-2-butenol) son los más correlacionados con el primer eje, y presentan, además, los mayores coeficientes de regresión en el modelo PLS.



**Figura 4.3.3.** Proyección de las variables olfatométricas sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Referencia de las variables, ver Tabla 4.2.3.

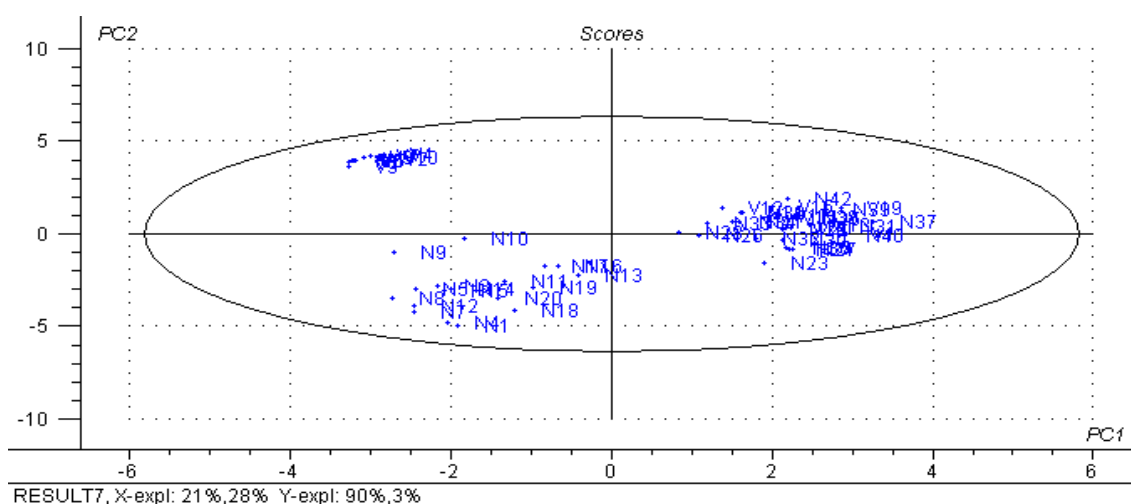
Contribuyen también con altos coeficientes de regresión ácidos como propanoico (v29), *i*-butanoico (v30), octanoico (v54) y decanoico (v71), fenoles como eugenol (v63), 4-VG (v68) y *m*-cresol (v58), ésteres como el 3-hidroxi-butirato de etilo (v27) y acetato de 2-feniletilo (v43), y metionol (v38). El ácido acético (v22) participa en este modelo con un coeficiente de regresión un orden de magnitud inferior al de las variables citadas.

En la Figura 4.3.4 se proyectan los valores (*scores*) de las distintas observaciones.

El análisis de componentes principales computado con las variables olfatométricas permite explicar el 49% de la varianza para las dos primeras componentes principales, no habiéndose observado *outliers* en este conjunto de sidras.



En esta figura, las sidras jóvenes se sitúan a la derecha de la primera componente principal, y las maduras a la izquierda. Entre estas últimas se establecen dos sub-categorías a lo largo del segundo eje, que permite diferenciar las muestras, además, por su lugar de origen. Ello pone de manifiesto la diferente tipicidad de las sidras asturianas y vascas cuando están más evolucionadas.



**Figura 4.3.4.** Proyección de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales. Sidras maduras: N1-22; V1-10; Sidras jóvenes; N23-40; V11-20).

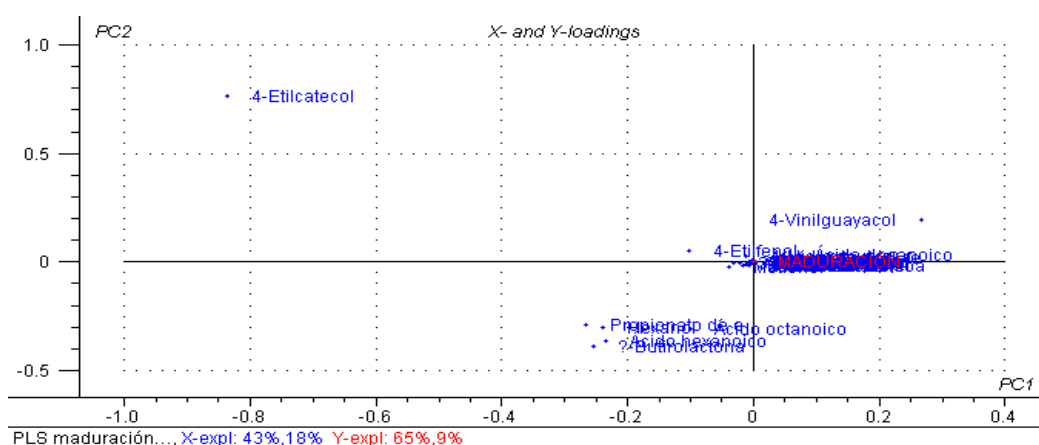
Tomando como variables predictoras los compuestos volátiles analizados, se obtiene el modelo discriminante resumido en la Tabla 4.3.3. Este modelo explica el 66 % de la varianza debida a la madurez de las sidras, con un error estándar de predicción de 0,29, que es un 12% inferior al error de calibración (0,26).

**Tabla 4.3.3.** Parámetros estadísticos del modelo discriminante de sidras en función de la madurez obtenido a partir de la concentración aromática.

	Calibración	Predicción
Pendiente (m)	0,73	0,69
Coeficiente de correlación (R)	0,86	0,81
Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0,74	0,66
Error estándar	SEC = 0,26	SEP = 0,29

SEC: error estándar de calibración; SEP: error estándar de predicción

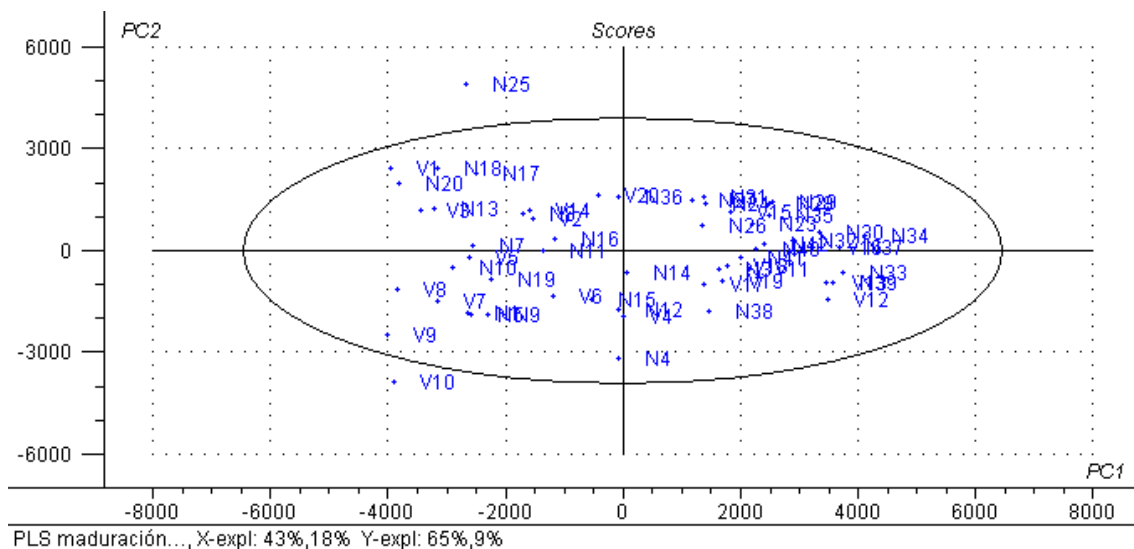
El análisis de componentes principales dio como resultado un modelo que permite explicar el 61% de la varianza con las dos primeras componentes. La proyección de los *loadings* de los analitos sobre el plano formado por éstas se muestra en la Figura 4.3.5. Destaca la relevante correlación del 4-EC con ambos ejes.



**Figura 4.3.5.** Proyección de los aromas en el plano formado por las dos primeras componentes principales.

En la Figura 4.3.6 se muestran los *scores* de las sidras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales, junto con la elipse de la  $T^2$  de Hotelling, que identifica dos muestras *outliers*: N25 y V10. La mayor parte de las sidras maduras se proyectan en la parte negativa, y las jóvenes, en la parte positiva del primer eje. Por lo tanto, Las variables más relacionadas con la maduración son 4-EC, 4-EF, hexanol, ácido hexanoico,  $\gamma$ -butirolactona y propionato de etilo; sin embargo, el 4-VG está asociado a las sidras más jóvenes.

La referencia V10 presentó las mayores concentraciones de hexanol y  $\gamma$ -butirolactona y sus contenidos de propionato de etilo y ácido hexanoico se sitúan también entre los más altos de la población analizada. Por el contrario, su nivel de 4-EC fue uno de los más bajos. La referencia N25 mostró la mayor concentración de 4-EC y la menor de 4-VG, mientras que el resto de compuestos identificados como discriminantes se encontraron en los rangos de concentración más bajos (Tabla 4.2.2).



**Figura 4.3.6.** Proyección de los scores de las sidras sobre el plano de las dos primeras componentes principales. Asturianas maduras: N1-20; asturianas jóvenes: N23-40; vascas maduras: V1-10; vascas jóvenes: V11-20.

Las variables con mayor coeficiente de regresión en el modelo PLS fueron el propionato de etilo, hexanol,  $\gamma$ -butirolactona, ácido hexanoico, 4-VG y 4-EC. De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 4.2.2, los contenidos de estos compuestos fueron superiores en las sidras maduras, excepto el 4-VG, que no fue detectado en las sidras vascas maduras.

**Influencia de la crianza  
sobre *borras* en el perfil  
aromático de la sidra  
natural**

- 5.1. Introducción**
- 5.2. Diseño experimental**
- 5.3. Resultados**



## 5.1. Introducción

La crianza sobre *borras* o lías es una etapa opcional en la elaboración de sidra que tradicionalmente se asocia con una mayor complejidad aromática y una mejora de los atributos visuales. Esta etapa es una práctica enológica habitual en la producción de vinos espumosos y en algún tipo de vino blanco. Hoy en día, el envejecimiento sobre lías está ganando relevancia también en la elaboración de vinos tintos en todas las zonas vitícolas (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002; Pérez- Serradilla y Luque de Castro, 2008).

La composición de las *borras* es muy variable, ya que están formadas principalmente por microorganismos (levaduras y bacterias) y sus productos de autólisis, junto con residuos orgánicos e inorgánicos provenientes del mosto. La autólisis de las levaduras proporciona a la sidra valiosos componentes macromoleculares, los cuales juegan un papel importante en el fenómeno de la estabilidad coloidal, la estimulación de la fermentación maloláctica y la mejora sensorial de los vinos (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002). Además, las *borras* son capaces de retener componentes indeseables, como sulfuros y fenoles volátiles (Chassagne *et al.*, 2005; Pradelles *et al.*, 2008; Vasserot *et al.*, 2003), lo cual refuerza las evidencias existentes de la capacidad de las *borras* para modificar las características organolépticas de los vinos.

En cuanto al aroma, existe controversia sobre la influencia de un breve contacto con lías en la composición del vino. Bueno *et al.* (2006) encontraron diferentes comportamientos en función de la variedad de uva utilizada en la elaboración; Bautista *et al.* (2007) observaron un incremento significativo generalizado de los compuestos volátiles del vino después del contacto con sus lías, mientras que otros investigadores (Loscos *et al.*, 2009) encontraron el efecto contrario. En el caso particular de los vinos espumosos, existen perfiles típicos de los compuestos volátiles relacionados con el tiempo de envejecimiento (Francioli *et al.*, 2003; Torrens *et al.*, 2010), y en sidras espumosas el tiempo de envejecimiento ha sido identificado como el principal responsable de los cambios en la composición aromática (Rodríguez Madrera *et al.*, 2008).

El manejo de las lías en la elaboración del vino ha sido el objeto de muchos trabajos. Algunas investigaciones incluyen la aplicación de microoxigenación para reducir los olores indeseables a sulfuros reducidos o para refinar el color y la estabilidad de vino (Gómez-Plaza y Cano-López, 2011), y el uso de enzimas para acelerar el proceso de autólisis o mejorar el potencial aromático de los vinos (Masino *et al.*, 2008; Moreno-Arribas y Polo, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Sánchez Palomo *et al.*, 2005; Torresi *et al.*, 2011).

Los estudios de crianza de la sidra sobre las *borras* son prácticamente inexistentes. Por ello, dada la repercusión que esta práctica puede tener sobre la calidad aromática de la sidra, en este capítulo abordaremos la influencia que la presencia de *borra*, la microoxigenación y la adición de enzima tienen sobre el perfil aromático y olfatométrico de la sidra natural.

## **5.2. Diseño experimental**

Mil litros de sidra en rama elaborados en un lagar local fueron distribuidos en diez tanques de acero inoxidable de 100 L. La sidra proviene de mosto de una mezcla de manzanas de sidra obtenido por el sistema tradicional y fermentación espontánea. Las *borras* provenientes de la fermentación de esta sidra fueron utilizadas sin ninguna otra manipulación. A todas las unidades experimentales, salvo los controles, se les añadieron *borras* (5% v/v), y diferentes combinaciones de enzima ( $\beta$ -glucanasa, 5g/hL) y oxígeno (6mL/L/mes). El experimento duró dos meses, durante los cuales la temperatura se mantuvo a 12 °C. Transcurrido este tiempo las sidras fueron muestreadas y analizadas.

La Figura 5.2.1 recoge el diseño experimental utilizado. Se trata de un diseño factorial ( $2^2$ ) de dos factores (microoxigenación y enzima) y dos niveles (ausencia/presencia) para cada factor. Se emplearon dos réplicas para cada combinación factorial y dos unidades control. También se comparó el factor *borras* frente a las muestras control.

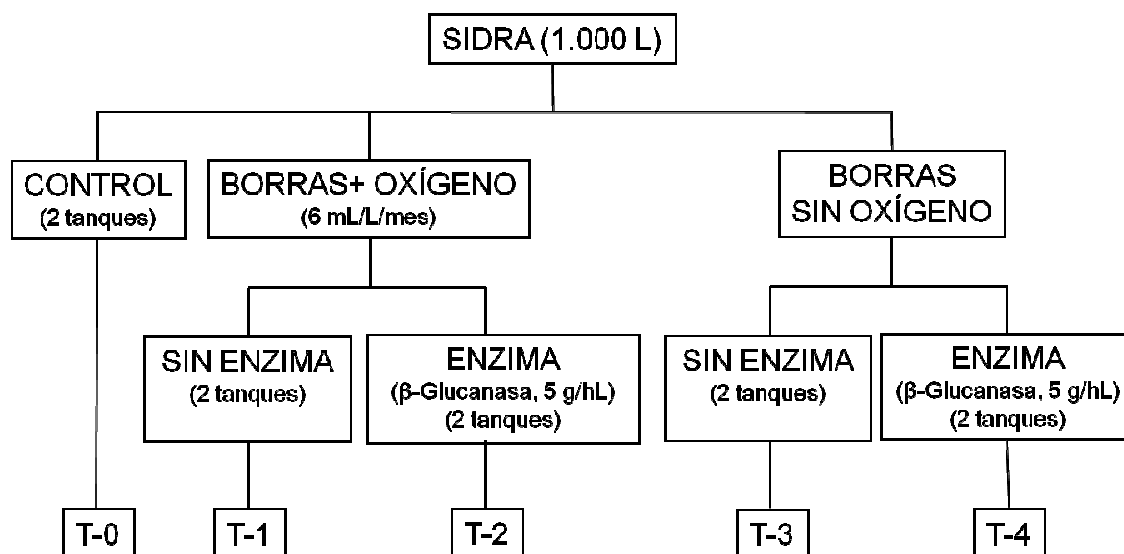


Figura 5.2.1. Representación esquemática del diseño experimental.

### 5.3. Resultados

#### *Perfil cuantitativo de las sidras*

En la Tabla 5.3.1 se resumen los datos comparativos obtenidos para la composición volátil de las sidras sometidas a contacto con *borras* y los controles.

Con relación a los volátiles mayoritarios, el contacto con *borras* dio lugar a un decrecimiento de los contenidos de *i*-butanol, alcoholes amílicos y acetoína, y al aumento de 1-propanol.

En cuanto a los compuestos volátiles minoritarios, el tratamiento con *borras* dio lugar a descensos significativos de los contenidos de 4-VG y acetatos, e incrementos de la concentración de todos los demás componentes analizados, excepto siete (ácido decanoico, 4-EG, *c*-3-hexenol, 3-hidroxi-butirato de etilo, 4-hidroxi-butirato de etilo,  $\gamma$ -butirolactona y metionol). Dicho aumento de la concentración fue notorio en el caso de 3-etoxi-1-propanol, 4-EC, octanoato de etilo y ácido octanoico.

La variación experimentada por varios compuestos (1-propanol, 4-VG, 4-EC, hexanol, *t*-3-hexenol, bencílico, hexanoato de etilo y 3-etoxi-1-propanol) en



**Tabla 5.3.1.** Efecto del contacto con *borras* en la composición volátil (media de tratamientos  $\pm$  DS) de las sidras estudiadas.

	<b>Sig</b>	<b>Control</b>	<b>Borras</b>
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>			
Acetaldehído	ns	10 $\pm$ 4	9 $\pm$ 3
Acetato de etilo	ns	41 $\pm$ 2	40 $\pm$ 3
Metanol	ns	50 $\pm$ 2	47 $\pm$ 5
1-Propanol	***	10 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2
<i>i</i> -Butanol	*	33 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3
1-Butanol	ns	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
Alcoholes amílicos <sup>a</sup>	*	233 $\pm$ 8	218 $\pm$ 18
Acetoína	***	35 $\pm$ 6	22 $\pm$ 6
Lactato de etilo	ns	56 $\pm$ 8	56 $\pm$ 6
2-Feniletanol	ns	150 $\pm$ 5	146 $\pm$ 11
<b>Volátiles minoritarios (<math>\mu</math>g/L)</b>			
<b>Ácidos grasos</b>			
Hexanoico	***	3.198 $\pm$ 488	4.232 $\pm$ 339
Octanoico	***	5.663 $\pm$ 669	13.543 $\pm$ 2.724
Decanoico	ns	2.268 $\pm$ 663	2.400 $\pm$ 1.124
<b>Fenoles Volátiles</b>			
4-Etilguayacol	ns	110 $\pm$ 75	159 $\pm$ 29
4-Etilfenol	***	1.735 $\pm$ 268	3.036 $\pm$ 178
4-Vinilguayacol	***	3.173 $\pm$ 458	1.832 $\pm$ 360
4-Etilcatecol	***	3.332 $\pm$ 1.040	14.002 $\pm$ 3.099
<b>Alcoholes</b>			
3-Metil-3-butenol	***	21 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2
1-Pentanol	***	55 $\pm$ 13	70 $\pm$ 6
3-Metil-2-butenol	***	17 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4
3-Metil-1-pentanol	*	74 $\pm$ 12	82 $\pm$ 5
Hexanol	***	3.741 $\pm$ 607	4.482 $\pm$ 296
<i>t</i> -3-Hexenol	**	32 $\pm$ 4	36 $\pm$ 3
<i>c</i> -3-Hexenol	ns	450 $\pm$ 84	499 $\pm$ 34
Bencílico	***	94 $\pm$ 21	179 $\pm$ 34
<b>Ésteres de etilo</b>			
2-Metilbutirato	**	17 $\pm$ 6	26 $\pm$ 4
Hexanoato	***	221 $\pm$ 41	317 $\pm$ 44
Octanoato	***	510 $\pm$ 103	1.841 $\pm$ 459
3-Hidroxibutirato	ns	47 $\pm$ 9	51 $\pm$ 6
4-Hidroxibutirato <sup>b</sup>	ns	725 $\pm$ 150	710 $\pm$ 126

Tabla 5.3.1. (Cont.)

	Sig	Control	Borras
<b>Acetatos</b>			
Isoamilo	***	455 ± 96	333 ± 43
2-Feniletilo	***	267 ± 75	102 ± 15
<b>Otros</b>			
3-Etoxi-1-propanol	***	70 ± 18	577 ± 169
γ-Butirolactona	ns	659 ± 118	699 ± 171
Metionol	ns	514 ± 89	449 ± 73

(a): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (b): cuantificado como 3-hidroxi-1-butirato de etilo; DS: desviación estándar; ns: no significativo; (\*\*\*): significativo al 1%; (\*\*): significativo al 5%; (\*): significativo al 10%.

las sidras en contacto con *borras* sigue la misma pauta que lo observado en las sidras maduras (Tabla 4.2.2).

El efecto de la aplicación de microoxigenación y enzima en la composición aromática de las sidras estudiadas se resume en la Tabla 5.3.2.

Entre los volátiles mayoritarios el efecto de la microoxigenación no fue significativo, mientras que la adición de enzima afectó al contenido de todos excepto el acetaldehído y acetato de etilo.

En cuanto a los ácidos grasos, se observó una tendencia hacia valores más elevados de concentración en las sidras sometidas a microoxigenación (Tabla 5.3.2), si bien solo se detectaron disminuciones significativas en el ácido decanoico cuando se añadió enzima.

Las sidras tratadas con oxígeno presentaron niveles significativamente más elevados de 3-etoxi-1-propanol. Así mismo, otros compuestos como el 4-hidroxi-1-butirato de etilo, la γ-butirolactona y el metionol experimentaron aumentos de sus concentraciones como consecuencia de la aplicación de microoxigenación, observándose una interacción significativa del enzima. Este último factor tuvo una influencia neta sobre el incremento de la concentración de octanoato de etilo (Tabla 5.3.2).

**Tabla 5.3.2.** Efecto de la aplicación de oxígeno y/o enzima en la composición volátil (media del tratamiento  $\pm$  DS) de las sidras estudiadas.

	Int	Ox	Enz	no-Oxígeno	Oxígeno	no-Enzima	Enzima
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>							
Acetaldehído	ns	ns	ns	11 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 5
Acetato de etilo	ns	ns	ns	38 $\pm$ 3	39 $\pm$ 6	39 $\pm$ 4	37 $\pm$ 5
Metanol	ns	ns	***	45 $\pm$ 5	43 $\pm$ 7	47 $\pm$ 6	42 $\pm$ 5
1-Propanol	ns	ns	***	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1
<i>i</i> -Butanol	ns	ns	**	30 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4
1-Butanol	ns	ns	**	3 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
Alcoholes amílicos <sup>a</sup>	ns	ns	***	209 $\pm$ 19	205 $\pm$ 29	218 $\pm$ 20	196 $\pm$ 24
Acetoína	**	ns	**	37 $\pm$ 25	32 $\pm$ 11	27 $\pm$ 9	42 $\pm$ 23
Lactato de etilo	**	ns	**	56 $\pm$ 5	57 $\pm$ 22	62 $\pm$ 19	51 $\pm$ 7
2-Feniletanol	ns	ns	**	139 $\pm$ 12	137 $\pm$ 18	146 $\pm$ 12	130 $\pm$ 14
<b>Volátiles minoritarios (<math>\mu</math>g/L)</b>							
<b>Ácidos grasos</b>							
Hexanoico	ns	ns	ns	3.906 $\pm$ 435	4.375 $\pm$ 654	4.215 $\pm$ 433	4.066 $\pm$ 731
Octanoico	ns	ns	ns	12.128 $\pm$ 2.497	13.227 $\pm$ 2.735	13.124 $\pm$ 2.064	12.361 $\pm$ 3.103
Decanoico	ns	ns	**	1.988 $\pm$ 922	2.148 $\pm$ 452	2.378 $\pm$ 839	1.757 $\pm$ 400
<b>Fenoles Volátiles</b>							
4-Etilguayacol	ns	ns	ns	123 $\pm$ 45	121 $\pm$ 30	133 $\pm$ 39	111 $\pm$ 33
4-Etilfenol	ns	ns	ns	2.772 $\pm$ 335	2.985 $\pm$ 440	2.945 $\pm$ 324	2.812 $\pm$ 465
4-Vinilguayacol	ns	ns	ns	1.716 $\pm$ 371	1.586 $\pm$ 322	1.745 $\pm$ 342	1.557 $\pm$ 339
4-Etilcatecol	*	***	ns	12.652 $\pm$ 2.630	18.159 $\pm$ 3.474	15.684 $\pm$ 3351	15.126 $\pm$ 4875

Tabla 5.3.2. (Cont.)

	Int	Ox	Enz	no-Oxígeno	Oxígeno	no-Enzima	Enzima
<b>Alcoholes</b>							
3-Metil-3-butenol	***	ns	ns	24 ± 4	28 ± 4	37 ± 3	25 ± 6
1-Pentanol	**	ns	ns	62 ± 10	70 ± 10	69 ± 8	63 ± 12
3-Metil-2-butenol	**	ns	ns	25 ± 5	29 ± 5	28 ± 3	26 ± 6
3-Metil-1-pentanol	**	ns	ns	75 ± 11	88 ± 12	84 ± 7	79 ± 17
Hexanol	**	ns	ns	4.041 ± 580	4.412 ± 629	4.347 ± 475	4.107 ± 740
<i>t</i> -3-Hexenol	**	ns	ns	32 ± 5	36 ± 6	35 ± 4	33 ± 7
<i>c</i> -3-Hexenol	ns	ns	ns	452 ± 66	518 ± 78	497 ± 52	473 ± 98
Bencílico	**	ns	ns	149 ± 39	168 ± 28	171 ± 27	147 ± 38
<b>Ésteres de etilo</b>							
2-Metilbutirato	ns	ns	ns	25 ± 3	24 ± 7	24 ± 4	25 ± 7
Hexanoato	ns	ns	ns	314 ± 40	315 ± 90	296 ± 42	334 ± 85
Octanoato	ns	ns	**	2.069 ± 640	1.922 ± 995	1.647 ± 442	2.343 ± 979
3-Hidroxibutirato	ns	ns	ns	46 ± 7	56 ± 8	52 ± 6	50 ± 11
4-Hidroxibutirato <sup>b</sup>	**	**	ns	628 ± 127	878 ± 147	773 ± 137	733 ± 226
<b>Acetatos</b>							
Isoamilo	ns	ns	ns	315 ± 62	312 ± 62	310 ± 49	318 ± 73
2-Feniletilo	ns	ns	ns	94 ± 14	96 ± 29	93 ± 17	97 ± 27
<b>Otros</b>							
3-Etoxi-1-propanol	ns	***	ns	515 ± 184	1.005 ± 134	788 ± 255	731 ± 337
γ-Butirolactona	**	**	ns	607 ± 165	955 ± 151	801 ± 183	762 ± 283
Metionol	**	**	ns	399 ± 77	536 ± 89	484 ± 83	450 ± 128

(a): corresponde a la suma de 2-metil-1-butenol y 3-metil-1-butenol; (b): cuantificado como 3-hidroxibutirato de etilo; Int: interacción; DS: desviación estándar; Ox: oxígeno; Enz: enzima; ns: no significativo; (\*\*\*): significativo al 1%; (\*\*): significativo al 5%; (\*): significativo al 10%.

El análisis ASCA ha sido recomendado en los casos donde se dispone de un gran número de variables muy correlacionadas y pocas observaciones, como es este caso, donde el análisis MANOVA puede tener dificultades para detectar efectos significativos de los factores sobre las variables correspondientes (Jansen *et al.*, 2005).

El análisis ASCA realizado dio cuatro vectores:  $X_{A1}$ ,  $X_{A2}$  (promedio de los tratamientos con y sin oxígeno, respectivamente) y  $X_{B1}$  y  $X_{B2}$  (promedio de los tratamientos con y sin enzima, respectivamente), que se proyectan sobre la única componente principal computada. Los vectores  $X_{A1}$  y  $X_{B2}$  tuvieron pesos (*loadings*) positivos, mientras que se observó lo contrario para  $X_{A2}$  y  $X_{B1}$ . Cinco variables químicas presentaron los pesos más significativos en esta componente principal. Por un lado, el 4-EC (0,97) se asoció con los tratamientos con oxígeno, mientras que se observó lo opuesto para el 4-VG (-0,06). Por otro lado, el contenido de octanoato de etilo se correlacionó con los tratamientos con enzima (-0,50), mientras que la producción de los ácidos octanoico (0,35) y decanoico (0,75) fue superior sin adición de  $\beta$ -glucanasa. Este tratamiento de los datos nos ha permitido confirmar la influencia de la aplicación de microoxigenación sobre el incremento de la concentración de 4-EC, o poner de manifiesto el efecto del enzima en el descenso del contenido de ácido octanoico, el cual no resultó significativo según el análisis de varianza.

### ***Perfil olfatométrico de las sidras***

En la Tabla 5.3.3 se muestran aquellos odorantes que aportan diferencias significativas en el análisis olfatométrico de las sidras tratadas con *borras*.

El contacto con *borras* produjo incrementos significativos de las intensidades olfatométricas de propionato de etilo, *c*-3-hexenol, ácido acético, alcohol bencílico y *m*-cresol. Lo contrario fue observado para el diacetilo.

**Tabla 5.3.3.** Odorantes significativamente influenciados por el contacto con *borras*.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	RefV	Sig.	Control	Borras
905	719	Frutal	Propionato de etilo	v1	*	0	19
972		Mantequilla	Diacetilo	v3	***	25	0
1404	867	Floral, dulce	c-3-Hexenol	v17	***	7	43
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Ácido acético	v22	*	28	47
1903	1071	Frutal, floral, dulce	Alcohol bencílico	v46	***	0	53
2109	1099	Cuero, establo	<i>m</i> -Cresol	v58	**	13	46

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; RefV: referencia de las variables; Sig: nivel de significación; (\*\*): significativo al 1%; (\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 10%.

El efecto de la aplicación de oxígeno o enzima se muestra en la Tabla 5.3.4. La aplicación de oxígeno dio lugar a incrementos en la intensidad de olor de ésteres como el hexanoato de etilo, y de algunos alcoholes (3-metil-2-butenol, *t*-3-hexenol), y a la disminución de la frecuencia media de 1-octen-3-ona, 4-EG y *c*-3-hexenol.

Por otro lado, la adición de enzima redujo la percepción del 3-metil-2-butenol.

Tabla 5.3.4. Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	Ref.V	Significación			Tratamientos			
					Int	Ox	Enz	no-Ox	Ox	no-Enz	Enz
<b>FM promedio ≥ 50%</b>											
1093	818	Fruta madura	Acetato de butilo	v6	***	***	***	57	63	55	65
1217	753	Tipo alcoholes superiores	Alcoholes amílicos	v8	ns	ns	ns	65	58	66	58
1240	1186	Fruta madura	Hexanoato de etilo	v10	ns	*	ns	44	60	46	59
1294	983	Setas	1-Octen-3-ona	v12	ns	*	ns	51	34	42	44
1299	805	Ahumado, tostado	3-Metil-2-butenol	v13	ns	***	**	40	74	63	52
1383	887	Floral, geranio	l-3-Hexenol	v16	ns	*	ns	50	69	58	61
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Ácido acético	v22	ns	ns	ns	52	63	58	58
1466		Polvo, rancio, vegetales cocidos	Metional	v23	ns	ns	ns	48	51	51	47
1635	954	Rancio, barniz	γ-Butirolactona	v34	ns	ns	ns	71	79	73	77
1681		Queso, rancio	Ácido 2-metilbutanoico	v36	ns	ns	ns	76	75	78	74
1735	1013	Vegetales cocidos, azufrado	Metionol	v38	ns	ns	ns	48	47	50	45
1837	1267	Compota, floral	Acetato de 2-feniletilo	v43	ns	ns	ns	57	63	63	58
1860	1174	Graso, establo	Ácido hexanoico	v44	ns	ns	ns	75	75	75	75
1903	1071	Frutal, floral, dulce	Alcohol bencílico	v46	ns	ns	ns	44	50	50	44
1929	1175	Rosas	2-Feniletanol	v47	ns	ns	ns	76	81	77	79
2047	1291	Dulce, especiado	4-Etilguayacol	v52	ns	*	ns	61	52	41	71
2086		Dulce, especiado	ni	v55	ns	ns	ns	57	82	69	71
2194	1165	Cuero, establo	4-Etilfenol	v64	ns	ns	ns	55	64	56	63
2210	1095	Ahumado, especiado, curry	Sotolón	v66	ns	ns	ns	81	78	75	84
2246	1279	Ahumado, especiado	4-Vinilguayacol	v68	ns	ns	ns	33	57	50	41
2285	1451	Graso, establo	Ácido decanoico	v71	ns	ns	ns	61	76	64	73

Tabla 5.3.4. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	Ref.V	Significación			Tratamientos			
					Int	Ox	Enz	no-Ox	Ox	no-Enz	Enz
<b>FM promedio &lt; 50%</b>											
905	719	Frutal	Propionato de etilo	v1	ns	ns	ns	22	9	13	18
931	721	Frutal	Acetato de propilo	v2	ns	ns	ns	48	44	46	47
972		Mantequilla	Diacetilo	v3	ns	ns	ns	6	17	3	20
1074	805	Frutal, dulce, manzana	2-Metilbutirato de etilo	v5	***	***	**	31	44	34	40
1234		Verdura cocida	ni	v9	ns	ns	ns	16	18	22	11
1280		Mantequilla, lácteo	Acetoína	v11	ns	ns	ns	0	10	7	13
1364	889	Floral, frutal	Hexanol	v15	ns	ns	ns	15	16	17	13
1404	867	Floral, dulce	c-3-Hexenol	v17	ns	***	ns	41	21	30	33
1440	1190	Frutal, hierba, resinoso	Octanoato de etilo	v21	ns	ns	ns	24	17	22	19
1494		Frutal, floral	3-Hidroxitirato de etilo	v27	ns	ns	ns	47	42	47	43
1529	909	Graso, pesado	Ácido <i>i</i> -butanoico	v30	ns	ns	ns	19	9	14	14
1653	1090	Floral	Fenilacetaldehído	v35	ns	ns	ns	26	34	28	32
1801		Floral, dulce	4-hidroxitirato de etilo <sup>a</sup>	v42	ns	ns	ns	18	22	30	21
1880	1118	Ahumado, especiado, dulce	Guayacol	v45	ns	ns	ns	29	22	30	21
2078	1358	Graso, establo, especiado	Ácido octanoico	v54	ns	ns	ns	45	33	40	38
2098		Cuero, establo	ni	v56	ns	ns	ns	34	30	24	40
2109	1099	Cuero, establo	<i>m</i> -cresol	v58	ns	ns	ns	34	31	41	24
2171	1476	Especiado, dulce, establo	$\gamma$ -Decalactona	v62	ns	ns	ns	18	30	21	27
2183	1385	Especiado, clavo	Eugenol	v63	ns	ns	ns	25	35	27	34
2261	1913	Resinoso, hierba seca	Hexadecanoato de etilo	v70	ns	ns	ns	16	19	16	22



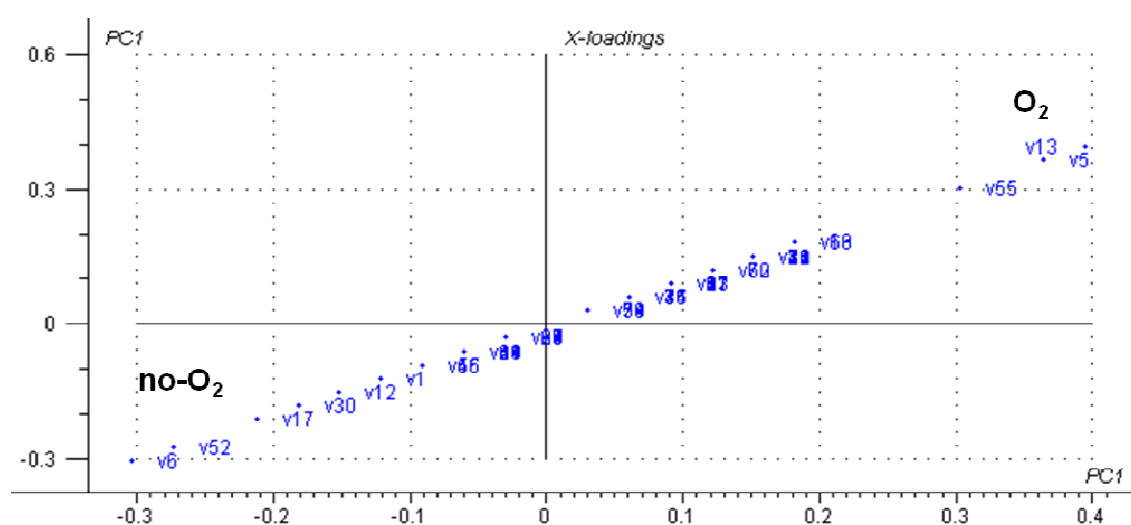
Tabla 5.3.4. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad	Ref.V	Significación			Tratamientos			
					Int	Ox	Enz	no-Ox	Ox	no-Enz	Enz
2333		Fenólico, establo	ni	v76	ns	ns	ns	19	28	35	12
2360		Especiado, fenólico	Isoeugenol	v77	ns	ns	ns	20	13	12	22

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; RefV: referencia de las variables; ni: no identificado; (\*\*): significativo al 1%; (\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 10%; ns: no significativo; Int: interacción; Ox: oxígeno; Enz: enzima.

En las Figuras 5.3.1 y 5.3.2 se muestran las proyecciones de las variables olfatométricas estudiadas sobre la componente principal calculada para cada factor, oxígeno y enzima.

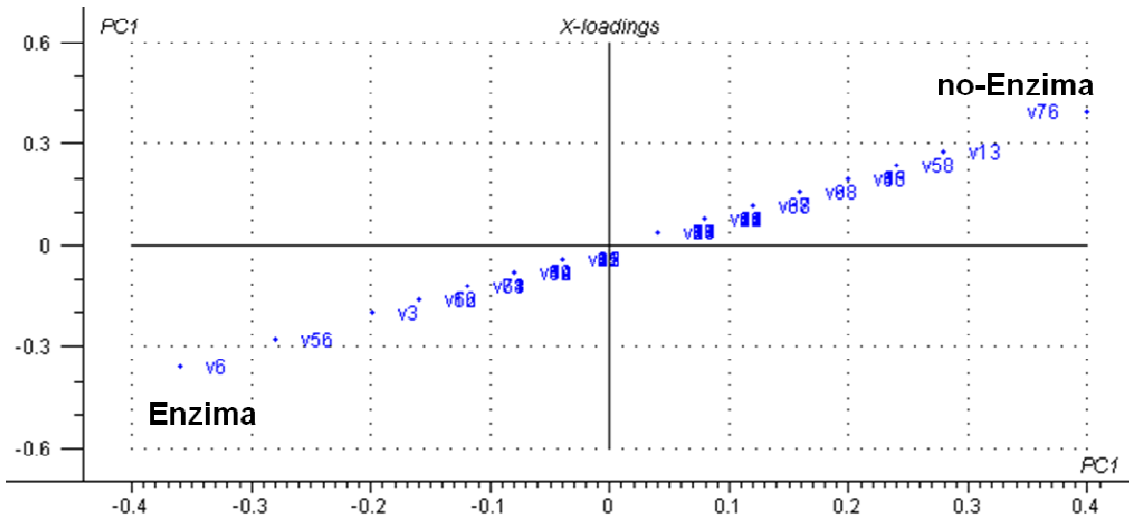
El 2-metilbutirato de etilo (v5), 3-metil-2-butenol (v13) y un odorante dulce (v55) fueron los más correlacionados con el oxígeno, mientras que acetato de butilo (v6), 4-EG (v52), *c*-3-hexenol (v17), ácido *i*-butanoico (v30), 1-octen-3-ona (v12) y propionato de etilo (v1) se correlacionaron con la ausencia de oxígeno (Figura 5.3.1).



**Figura 5.3.1.** Proyección de las variables olfatométricas para el tratamiento con oxígeno. Referencia de las variables, ver Tablas 5.3.3 y 5.3.4.

En relación con el segundo factor, un pico descrito como fenólico, establo (v76), 3-metil-2-butenol (v13), y *m*-cresol (v58) se asociaron con la ausencia de enzima, mientras que acetato de butilo (v6), diacetilo (v3), y otro odorante dulce (v56) estuvieron vinculados a los tratamientos con  $\beta$ -glucanasa (Figura 5.3.2).

La evaluación de los datos olfatométricos mediante ASCA ha permitido confirmar la influencia de los factores tecnológicos estudiados en el caso del acetato de butilo y del 2-metilbutirato de etilo para los que se había observado una interacción muy significativa (Tabla 5.3.4). De acuerdo con este análisis multivariante, la aplicación de oxígeno y/o enzima podría potenciar la intensidad de percepción de estos odorantes.



**Figura 5.3.2.** Proyección de las variables olfatométricas para el tratamiento con enzima. Referencia de las variables, ver Tablas 5.3.3 y 5.3.4.

En el caso de las variables v55 (IRL 2079), v3 (diacetilo), v30 (ácido *i*-butanoico) y v56 (IRL 2098), no se observó efecto significativo de los factores estudiados (Tabla 5.3.4), sin embargo, mediante ASCA se ha podido poner de manifiesto la influencia del oxígeno y del enzima en las variaciones de percepción experimentadas por estos compuestos. Así mismo, y en coherencia con los resultados del análisis de varianza, la técnica ASCA ha identificado una interacción muy elevada con las variables v6 y v5 (acetato de butilo y 2-metilbutirato de etilo). Otras interacciones relevantes han sido las correspondientes al ácido octanoico (v54), los odorantes v76 (IRL 2333), v77 (isoeugenol) y v27 (3-hidroxibutirato de etilo).

Estos hechos indican que la adición del enzima tiene un efecto diferente sobre la percepción de los odorantes en función de la presencia de oxígeno.

**Sidra natural de nueva expresión: influencia de las condiciones de conservación**

**6.1. Introducción**

**6.2. Descripción de sidras de nueva expresión de mercado**

6.2.1. Muestras

6.2.2. Resultados

**6.3. Efecto de las condiciones de conservación en la composición aromática de la sidra**

6.3.1. Diseño experimental

6.3.2. Resultados

**6.4. Influencia de la composición aromática en los perfiles sensoriales de la sidra**

6.4.1. Perfiles sensoriales de sidras de mercado

6.4.2. Variación de los perfiles sensoriales de las sidras durante el periodo de conservación en botella

6.4.3. Modelos de predicción de atributos sensoriales



## 6.1. Introducción

El aroma de una bebida fermentada es el resultado de múltiples factores: agroecológicos, prácticas de elaboración, métodos de estabilización, y condiciones de conservación (tiempo y temperatura) una vez embotellada.

En el ámbito del vino, los trabajos dirigidos a estudiar la naturaleza y amplitud de los cambios -químicos o sensoriales- asociados a la permanencia en botella son numerosos. Entre los estudios enfocados a determinar la influencia de esta etapa sobre la composición aromática podemos citar los realizados por González-Viñas *et al.* (1996, 1998) en vinos de la variedad Airén, los de Pérez Coello *et al.* (2003) sobre vinos blancos del mercado, o los de Sirvertsen *et al.* (2001) en vinos chilenos de Cabernet Sauvignon. A grandes rasgos, los resultados indican una disminución de la concentración de ésteres, la pérdida de los característicos atributos de fresco y frutal, y la aparición de aromas especiados y vegetales.

La temperatura de conservación es un aspecto primordial, siendo aceptable en el caso de los vinos un rango comprendido entre 5 y 18 °C (Tao *et al.*, 2014). A temperaturas inferiores a 10° C, Hernanz *et al.* (2009) observaron un decrecimiento progresivo de la concentración volátil de vinos blancos, con una disminución más pronunciada de los alcoholes, mientras que Garde-Cerdán *et al.* (2008) han descrito un incremento de los contenidos de ésteres y ácidos grasos durante el almacenamiento. La conservación de vinos a temperaturas próximas o superiores a 20 °C origina la aparición de notas leñosas, ahumadas y espárragos en conserva, posiblemente relacionados con reacciones de oxidación (Makhotina *et al.*, 2012). Hopfer *et al.* (2013) analizaron los efectos combinados de la temperatura, el embalaje y el corcho sobre las propiedades sensoriales y físico-químicas de vinos Cabernet Sauvignon almacenados seis meses, encontrando diferencias significativas en función de la temperatura. Las reacciones de oxidación durante el tiempo de conservación han sido asociadas con diversas transformaciones, entre otras, con la formación y degradación de compuestos azufrados (Lee *et al.*, 2011; Ugliano, 2013).

La filtración siempre ha sido un tema de controversia, especialmente en lo relacionado con su influencia sobre la calidad del vino. Sin embargo, son relativamente escasos los estudios diseñados para evaluar los efectos de este proceso sobre las características organolépticas del producto final. Entre estos, cabe mencionar el realizado por Arriagada-Carrazana *et al.* (2005), quienes compararon los perfiles aromáticos, fenólicos y sensoriales de vinos de Cabernet Sauvignon, antes y después de su filtración a través de membranas de tamaño de poro de 0,65  $\mu\text{m}$ . Sus resultados indican una influencia significativa de esta etapa. Análogamente, Jiménez-Moreno *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la filtración a través de tierra de diatomeas sobre el contenido en ésteres del vino, observando una pérdida significativa de estos compuestos en las muestras sometidas a filtración tras la maduración en tonel.

La sidra natural de nueva expresión es un producto con una cierta presencia en el mercado asturiano, elaborada de acuerdo con las prácticas tradicionales utilizadas en nuestra región pero sometida a una etapa final de clarificación por filtración (Figura 1.1.6). Está destinada a grupos de consumidores potencialmente interesados por bebidas frescas y de baja graduación, pero no habituados a la turbidez típica de la sidra natural tradicional.

Desde el punto de vista tecnológico y comercial, es importante conocer la influencia de etapas como la filtración o la conservación en botella sobre las características químicas y sensoriales de la sidra y, hasta donde alcanza nuestra información, no se conocen estudios similares a los mencionados anteriormente en esta bebida. El objetivo de este capítulo es, por un lado, describir el perfil aromático de la sidra de nueva expresión presente en el mercado y, por otro, evaluar el efecto de las condiciones de conservación (temperatura y tiempo de permanencia en botella) sobre la composición aromática y las características organolépticas de este producto.

## **6.2. Descripción de sidras de nueva expresión de mercado**

### **6.2.1. Muestras**

Se analizaron nueve muestras elaboradas en diferentes bodegas de la región comercializadas durante la campaña 2009. Se tomaron seis botellas por muestra que fueron almacenadas a 12° C hasta el análisis, durante un tiempo máximo de un mes. Estas sidras fueron elaboradas con diferentes mezclas de manzana, de acuerdo con las condiciones particulares utilizadas por cada bodega, todas ellas, excepto una, amparadas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen “Sidra de Asturias” (Tabla 6.2.1).

### **6.2.2. Resultados**

#### ***Parámetros enológicos***

En la Tabla 6.2.1 se resumen los parámetros enológicos de las sidras estudiadas. A grandes rasgos, se trata de bebidas secas, con una graduación promedio de 6,33 (% v/v), y con una ligera aguja.

Todos los parámetros analizados en este conjunto de sidras fueron concordantes con los observados en las sidras tradicionales jóvenes. La referencia INIA 23 se aparta de esta tendencia general, ya que fue la que presentó el mayor valor de acidez volátil y la menor concentración de glicerina. El modo de elaboración de esta sidra es también único en este conjunto, ya que no incluye la filtración como sistema de estabilización, sino un periodo prolongado de decantación en tonel.



**Tabla 6.2.1.** Características y métodos de elaboración de las sidras de nueva expresión de mercado analizadas.

	INIA 3	INIA 4	INIA 5	INIA 6	INIA 9	INIA 10	INIA 11	INIA 23	INIA 24
Mezcla de manzana	Acidulada	Ácido-amarga	Ácido-amarga	Acidulada	Acidulada	Ácido-amarga	Ácida	Ácido-amarga	Acidulada
Enzimas pectolíticas	-	Sí	-	-	-	Sí	-	-	-
Prensa	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Tradicional	Tradicional	Rápida
Levaduras seleccionadas	No	Sí	No	No	No	Sí	No	No	No
Filtración*	1	1	2	4	1	3	2	5	4
Grado alcohólico (%v/v)	6,08	5,6	6,04	5,98	6,64	6,5	6,49	6,44	7,24
pH	3,64	3,53	3,71	3,69	3,81	3,83	3,85	3,76	3,73
Acidez volátil (g ác. acético/L)	0,28	0,26	1,18	0,67	1,63	0,37	1,15	1,83	1,68
Acidez total (g ác. sulfúrico/L)	2,69	3,44	4,06	3,26	3,72	2,59	3,63	4,28	3,73
Ácido láctico (g/L)	5,3	6,7	6,2	6,2	5	5,6	5,7	6,4	4,9
Glicerina (g/L)	4,3	4	2,2	3,4	3,8	4,3	2,4	0,7	4
Sorbitol (g/L)	6,4	7,8	8,3	7,5	7,2	8,9	8,6	8,1	5,3
Presión (Bares, 20 °C)	0,99	0,97	1,6	2,92	1,13	1,07	1,07	1,6	0,99

(1): Microfiltración por membranas de tamaño nominal de poro de 0,45µm; (2): placas, 0,45µm; (3): tierra de diatomeas; (4): microfiltración por membranas tamaño absoluto de 0,65µm; (5): decantación prolongada en tonel.

### **Perfil cuantitativo de las sidras**

Los resultados obtenidos en el análisis de compuestos volátiles junto con su evaluación estadística se resumen en la Tabla 6.2.2. Se han observado diferencias significativas entre las sidras en su concentración aromática.

Entre los componentes mayoritarios, el lactato de etilo, los alcoholes amílicos y el 2-feniletanol fueron, en promedio, los más importantes. En este conjunto de muestras destacaron las referencias 4, 6 y 24 por sus menores contenidos en 2-feniletanol; en la situación opuesta se encuentra la sidra denominada INIA 23.

Con respecto a los compuestos volátiles minoritarios, los ácidos grasos constituyeron alrededor del 40% de esta fracción aromática, seguidos por alcoholes (20%) y fenoles volátiles (20%). Los ésteres de etilo y acetatos representaron en conjunto alrededor del 5%. Asimismo, otros componentes, como la  $\gamma$ -butirolactona, alcanzaron niveles de concentración importantes

En este grupo de muestras destacaron las referencias 23 y 11 por sus concentraciones de ácidos grasos, fundamentalmente octanoico, junto con INIA 4. La referencia INIA 23 presentó también uno de los niveles más altos en fenoles volátiles y ésteres de etilo, los mayores contenidos en alcoholes, y la menor concentración de  $\gamma$ -butirolactona. La sidra INIA 9 presentó el mayor contenido de fenoles volátiles, seguida de las muestras 23 y 6.

Tabla 6.2.2. Composición volátil de las sidras estudiadas.

	INIA3	INIA 4	INIA 5	INIA 6	INIA 9	INIA 10	INIA 11	INIA 23	INIA 24	Media	DS
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>											
Acetato de etilo	38c	17a	64f	45d	81h	33b	72g	55e	123i	59	31
Metanol	31c	35d	34cd	17a	64g	28b	54f	44e	130h	49	34
1-Propanol	10a	12b	43f	12b	33e	13b	19c	45g	24d	23	14
iso-Butanol	51e	32c	97g	25a	33c	45d	61f	28b	102h	53	29
Alcohol alílico	nd	nd	17c	nd	4a	nd	29d	7b	nd	6	11
1-Butanol	4a	nd	nd	2a	6c	2a	6bc	5b	5b	3	2
Alcoholes amílicos <sup>1</sup>	255g	168b	301h	126a	168b	246f	237e	211c	218d	214	53
Lactato de etilo	231g	132b	166d	201f	188e	209f	117a	141c	258h	183	47
2-Feniletanol	152f	17a	156g	16a	86c	137e	128d	244h	25b	107	78
<b>Volátiles minoritarios (µg/L)</b>											
<b>Ácidos grasos</b>											
Hexanoico	2.544b	4.375e	2.919c	4.247e	2.837c	1.774a	2.836c	5.170f	3.845d	3.394	1.074
Octanoico	4.737de	5.975f	4.301cd	4.790e	3.384b	3.976c	6.127f	11.072g	2.162 <sup>a</sup>	5.169	2.528
Decanoico	1.581d	1.058b	1.211c	1.011b	1.333c	1.591d	2.271e	4.331f	<LC	1.626	1.151
<b>Fenoles volátiles</b>											
4-Etilguayacol	643d	265b	637d	1.529f	1.080e	93a	477c	128 <sup>a</sup>	226b	564	479
4-Etilfenol	1.371a	2.509d	1.723b	2.856e	3.181f	1.616b	2.308c	2.926e	1.317a	2.200	712
4-Vinilguayacol	355bc	1.235e	609d	329b	411c	1.229e	144 <sup>a</sup>	2.428f	307b	783	733
4-Etilcatecol	504a	617a	586a	3.296c	6.929d	442a	3.401c	3.427c	1.180b	2.264	2.196

Tabla 6.2.2. (Cont.)

	INIA3	INIA 4	INIA 5	INIA 6	INIA 9	INIA 10	INIA 11	INIA 23	INIA 24	Media	DS
<b>Alcoholes</b>											
3-Metil-3-butenol	<LC	<LC	24e	18c	33g	<LC	19d	43h	29f	22	11
1-Pentanol	45c	37b	54d	39b	110e	35b	<LC	219f	108e	72	65
3-Metil-2-butenol	14b	11 <sup>a</sup>	41e	17c	41e	17c	34d	72f	33d	31	19
3-Metil-1-pentanol	43e	8 <sup>a</sup>	35d	9a	41e	23c	48f	93g	20b	36	26
Hexanol	3.646b	3.910bc	4.394cd	5.736f	5.266ef	2.746a	4.245c	7.638g	4.831de	4.712	1.409
<i>t</i> -3-Hexenol	23b	41f	34d	37e	30c	18a	40f	51g	34d	34	10
<i>c</i> -3-Hexenol	421f	103a	274d	341e	177b	216c	185b	548g	190b	273	141
Alcohol bencílico	64ab	55a	321g	78b	267f	141c	219d	374h	240e	195	117
<b>Esteres de etilo</b>											
2-Metilbutirato	9ab	7a	11b	23c	30d	10b	29d	35e	33e	21	11
Hexanoato	105b	204f	131c	229g	132c	91a	148d	217fg	168e	158	49
Octanoato	158d	181e	172e	172e	144c	132b	203f	324g	102 <sup>a</sup>	176	63
3-Hidroxibutirato	18b	8a	14 <sup>ab</sup>	44c	124f	18b	68d	99e	120f	57	47
4-Hidroxibutirato <sup>2</sup>	239c	262d	446f	283d	610g	174a	377e	379e	217b	332	136
<b>Acetatos</b>											
Isoamilo	428e	389d	472f	77a	199b	396d	370d	528g	314c	353	139
2-Feniletilo	478h	41d	167f	<LC	84e	55cd	72de	208g	24b	126	147
<b>Otros</b>											
3-Etoxi-1-propanol	39a	35a	312e	84b	179c	97b	748g	364f	252d	234	226
$\gamma$ -Butirolactona	1.879d	3.864f	2.567e	3.804f	1.485c	1.008b	850b	361a	1.437c	1.917	1.254
Metionol	557c	622d	1,012h	418b	360a	710e	363a	933g	785f	640	240

(1): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (2): cuantificado como 3-hidroxibutirato de etilo; LC: Límite de cuantificación; Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

### **Perfil olfatométrico de las sidras**

Los resultados del estudio olfatométrico se presentan en la Tabla 6.2.3. Se establecieron dos grupos de odorantes atendiendo a la FM (%) media del conjunto. El primer grupo está formado por 20 compuestos con frecuencias modificadas medias entre 50 y 78% y, por lo tanto, claramente percibidos en todas las sidras. El valor promedio más alto de la FM correspondió al 4-EG y al ácido 2-metilbutanoico (78%), seguido por el 2-feniletanol (75%).

En el segundo grupo se encontraron 35 odorantes, entre los cuales, otro fenol volátil, el 4-VG, presentó el valor más alto de FM media (46%). La mayoría de los odorantes incluidos en este grupo (24) no fueron percibidos en alguna de las muestras y otros, como metionol, eugenol y  $\gamma$ -decalactona alcanzaron valores de FM superiores al 50% en algunas sidras.

Como se muestra en la Tabla 6.2.3, 23 de los 35 compuestos incluidos en este grupo, y cinco de los 20 presentes en el primero, permiten discriminar entre muestras. Algunos de estos odorantes potencialmente diferenciadores, como por ejemplo, 1-octen-3-ona, metionol, eugenol, *cis*-3-hexenol, y los ácidos octanoico, propanoico e *i*-butanoico fueron significativamente asociados con el grado de maduración de la sidra natural tradicional.

Tabla 6.2.3. Perfiles olfatométricos de las sidras de nueva expresión de mercado.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	Sig.	Ref.V	I3	I4	I5	I6	I9	I10	I11	I23	I24	Media
<i>FM promedio ≥ 50%</i>															
931	721	Frutal	Acetato de propilo	ns	v2	64	62	56	54	53	59	51	47	68	57
1074	805	Frutal, dulce, manzana	2-Metilbutirato de etilo	ns	v5	69	46	55	65	48	68	70	75	75	63
1217	753	Tipo alcoholes superiores	Alcoholes amílicos	ns	v8	69	76	75	65	66	65	72	58	65	68
1240	1186	Fruta madura	Hexanoato de etilo	ns	v10	65	44	37	56	45	52	52	35	59	50
1294	983	Setas	1-Octen-3-ona	**	v12	63	43	32	48	72	47	53	70	72	55
1299	805	Ahumado, tostado	3-Metil-2-butenol	ns	v13	40	69	59	48	26	65	68	51	58	54
1383	887	Floral, geranio	l-3-Hexenol	ns	v16	75	74	76	69	73	71	68	72	80	73
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Acido acético	ns	v22	53	40	65	56	61	56	74	56	65	58
1635	954	Rancio, barniz	γ-Butirolactona	ns	v34	75	80	61	77	77	76	81	72	67	74
1681		Queso, rancio	Acido 2-metilbutanoico	ns	v36	84	73	76	77	79	83	76	79	77	78
1837	1267	Compota, floral	Acetato de 2-feniletilo	ns	v43	69	45	74	55	53	56	56	69	49	59
1860	1174	Graso, establo	Acido hexanoico	ns	v44	70	71	76	66	67	76	73	73	83	73
1903	1071	Frutal, floral, dulce	Alcohol bencílico	**	v46	47	16	66	51	64	52	40	56	64	50
1929	1175	Rosas	2-Feniletanol	ns	v47	59	78	76	84	82	82	74	63	81	75
2047	1294	Dulce, especiado	4-Etilguayacol	ns	v53	77	77	75	76	77	77	78	85	77	78
2078	1358	Graso, establo, especiado	Acido octanoico	**	v54	78	58	62	65	59	81	78	73	63	69
2153		Cuero, ahumado	ni	**	v60	79	40	47	43	67	41	47	47	76	54
2194	1165	Cuero, establo	4-Etilfenol	ns	v64	70	76	65	57	76	65	77	69	62	68
2210	1095	Ahumado, especiado, curry	Sotolón	ns	v66	65	85	61	77	46	55	81	85	72	70
2285	1451	Graso, establo	Acido decanoico	**	v71	68	65	35	55	36	77	73	77	45	59

Tabla 6.2.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	Sig.	Ref.V	I3	I4	I5	I6	I9	I10	I11	I23	I24	Media
<i>FM promedio &lt; 50%</i>															
905	719	Frutal	Propionato de etilo	ns	v1	9	0	34	13	27	16	18	28	6	17
1057	804	Frutal	Butirato de etilo	**	v4	38	44	7	44	42	26	38	48	47	37
1093	818	Fruta madura	Acetato de butilo	**	v6	31	44	0	27	13	0	0	6	0	14
1144	879	Frutal, plátano	Acetato de isoamilo	ns	v7	20	13	29	0	16	25	24	16	30	19
1364	889	Floral, frutal	Hexanol	ns	v15	43	21	47	46	37	52	18	27	39	37
1404	867	Floral, dulce	c-3-Hexenol	**	v17	49	9	7	30	0	36	29	53	0	24
1413		Vinagre, tipo alcoholes superiores	ni	**	v18	0	0	0	0	22	36	0	0	0	7
1419		Dulce, especiado	ni	**	v19	0	0	7	0	0	0	0	0	65	8
1432	1016	Dulce, especiado, frutal	2-Octanol	**	v20	29	6	0	9	34	0	0	29	0	12
1440	1190	Frutal, hierba, resinoso	Octanoato de etilo	**	v21	52	60	17	63	6	40	29	27	24	35
1466	908	Polvo, rancio, vegetales cocidos	Metional	**	v23	0	49	0	0	25	9	9	0	9	11
1486		Frutal, floral, dulce	ni	**	v26	0	0	0	0	47	6	34	16	20	14
1494	957	Frutal, floral	3-Hidroxibutirato de etilo	ns	v27	36	25	21	18	27	38	36	29	33	29
1519	856	Graso, establo	Acido propanoico	**	v29	0	0	68	0	0	0	0	57	0	14
1529	909	Graso, pesado	Acido iso-butanoico	**	v20	6	0	32	22	60	29	0	40	51	27
1554	1096	Graso, resinoso	1-Octanol	**	v32	59	17	32	0	19	20	9	0	0	17
1567	966	Lácteo, queso azul	Acido butanoico	**	v33	45	38	45	6	0	17	22	9	55	26
1653	1090	Floral	Fenilacetaldéido	**	v35	77	6	65	13	46	30	47	58	19	40
1735	1013	Vegetales cocidos, azufrado	Metionol	ns	v38	38	60	42	57	16	59	34	48	43	44
1775		Floral, frutal, coco	ni	**	v41	49	13	15	13	49	0	29	40	53	29
1801		Dulce, floral	4-Hidroxibutirato de etilo	ns	v42	22	16	34	6	6	13	13	13	13	15
1880	1118	Ahumado, dulce, especiado	Guayacol	ns	v45	37	39	39	40	38	40	9	25	43	35
1986		Floral, especiado	ni	ns	v49	44	6	45	19	0	29	27	29	34	26
2001	1088	Ahumado	o-Cresol	ns	v50	29	26	42	21	53	41	29	30	20	32

Tabla 6.2.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	Sig.	Ref.V	I3	I4	I5	I6	I9	I10	I11	I23	I24	Media
2100	1123	Cuero, establo	<i>p</i> -Cresol	ns	v57	0	0	47	29	17	26	27	43	23	24
2109	1099	Cuero, establo	<i>m</i> -Cresol	ns	v58	40	30	24	47	10	23	18	0	28	25
2171	1476	Especiado, dulce, establo	$\gamma$ -Decalactona	ns	v62	0	9	34	70	60	51	40	73	29	41
2183	1385	Especiado, clavo	Eugenol	**	v63	70	76	54	0	41	65	0	0	62	41
2219		Ahumado	ni	**	v65	0	0	0	9	40	60	0	0	0	12
2246	1279	Ahumado, especiado	4-Vinilguayacol	**	v68	63	34	29	62	61	37	53	49	26	46
2261	1913	Resinoso, hierba seca	Hexadecanoato de etilo	**	v70	0	0	0	0	0	36	6	34	38	13
2305		Floral, vegetal	ni	**	v73	0	0	0	0	33	6	18	9	36	11
2323		Balsámico, dulce	ni	**	v74	6	0	0	0	0	0	31	27	40	12
2333		Establo, fenólico	ni	**	v75	11	6	7	42	65	31	54	56	35	34
2360	1496	Especiado, fenólico	Isoeugenol	**	v77	45	51	0	19	9	6	6	0	24	18

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; ni: no identificado; RefV: referencia de las variables Sig: significación; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%; I3-I24: muestras INIA 3 a 24.



### 6.3. Efecto de las condiciones de conservación en la composición aromática de la sidra

#### 6.3.1. Diseño experimental

Se analizaron 42 sidras, recogidas en sus bodegas de origen (6), y obtenidas según las prácticas de rutina de cada lagar. De acuerdo con la información facilitada por los elaboradores, las sidras fueron clarificadas mediante filtración, en su mayoría a través de filtros de membrana o polipropileno de tamaño nominal de poro de  $0,45\mu\text{m}$  y, esporádicamente, por placas y tierras de diatomeas (un elaborador en cada caso). La clarificación se llevó a cabo a temperatura controlada, entre  $6$  y  $9^\circ\text{C}$ .

Las muestras analizadas se distribuyeron de acuerdo con el diseño ilustrado en la Figura 6.3.1. El conjunto estudiado consistió en seis sidras en rama (tradicionales no filtradas) y sus correspondientes productos filtrados. Las sidras en rama se almacenaron a  $12^\circ\text{C}$ , mientras que las sidras filtradas fueron divididas en dos grupos y conservadas a  $12^\circ$  y  $20^\circ\text{C}$ . Los muestreos fueron realizados transcurridos 1, 6 y 12 meses desde su embotellado.

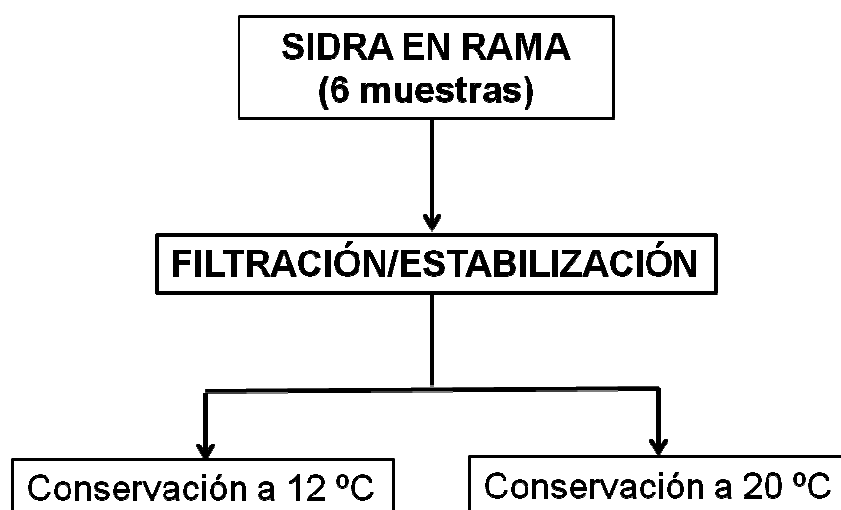


Figura 6.3.1. Esquema del diseño experimental.

### 6.3.2. Resultados

#### ***Perfil cuantitativo de las sidras***

En la Tabla 6.3.1 se resumen los perfiles aromáticos cuantitativos de las sidras incluidas en el diseño experimental. En esta tabla se presentan los valores promedio en cada punto de muestreo y se incluyen los resultados de la evaluación de la influencia del tiempo de conservación obtenidos mediante un análisis de varianza de medidas repetidas.

El análisis de varianza efectuado dio como resultado la ausencia de diferencias significativas para el factor temperatura en todos los aromas. Por su parte, el tiempo de embotellado sí tuvo una influencia significativa sobre la composición aromática de las sidras de nueva expresión, no encontrándose interacción entre ambos factores.

Entre los aromas mayoritarios, solo el lactato de etilo experimentó cambios en su contenido durante el periodo estudiado. Por lo que se refiere a los aromas minoritarios, hay que resaltar que el ácido hexanoico alcanzó un máximo de concentración transcurridos seis meses en botella. Sin embargo, el ácido decanoico aumentó su contenido ( $p < 0,050$ ) tras seis meses de almacenamiento, no experimentando variaciones significativas posteriormente.

Por lo que respecta a los fenoles volátiles, conviene destacar que ni el 4-EG ni el 4-EF experimentaron cambios a lo largo de todo el periodo estudiado, sin embargo, el 4-VG aumentó significativamente su contenido a los seis meses de embotellado, disminuyendo con posterioridad. Por su parte, el 4-EC aumentó su concentración a los 12 meses.

En relación con los alcoholes, el 3-metil-3-butenol, el 3-metil-1-pentanol y el *t*-3-hexenol permanecieron constantes a lo largo del año. En general, se detectó que los alcoholes alcanzaron un máximo de concentración a los seis meses del embotellado. El *c*-3-hexenol tuvo un comportamiento diferente, ya que disminuyó a lo largo del periodo de almacenamiento.

**Tabla 6.3.1.** Composición aromática de las sidras ( $\pm$  DS) tras el proceso de filtración y embotellado.

	Int.	Sig.	1 Mes	6 Meses	12 Meses
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>					
Acetaldehído			3 $\pm$ 2	< L.C.	< L.C.
Acetato de etilo	ns	ns	66 $\pm$ 40	69 $\pm$ 37	72 $\pm$ 33
Metanol	ns	ns	48 $\pm$ 21	49 $\pm$ 20	43 $\pm$ 17
2-Butanol	ns	ns	8 $\pm$ 10	8 $\pm$ 10	7 $\pm$ 9
1-Propanol	ns	ns	23 $\pm$ 8	23 $\pm$ 8	22 $\pm$ 8
<i>i</i> -butanol	ns	ns	35 $\pm$ 9	35 $\pm$ 8	32 $\pm$ 8
Alcohol alílico	ns	ns	6 $\pm$ 5	6 $\pm$ 5	6 $\pm$ 5
1-Butanol	ns	ns	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
Alcoholes amílicos <sup>1</sup>	ns	ns	193 $\pm$ 31	195 $\pm$ 31	182 $\pm$ 28
Lactato de etilo	ns	***	197ab $\pm$ 32	209b $\pm$ 28	182a $\pm$ 30
2-Feniletanol	ns	ns	83 $\pm$ 36	84 $\pm$ 36	79 $\pm$ 32
<b>Volátiles minoritarios (<math>\mu</math>g/L)</b>					
<b>Ácidos grasos</b>					
Hexanoico	ns	**	2.965ab $\pm$ 583	3.270b $\pm$ 809	2.618a $\pm$ 450
Octanoico	ns	ns	3.632 $\pm$ 1.679	4.216 $\pm$ 1.451	3.945 $\pm$ 1.306
Decanoico	ns	**	1.084ab $\pm$ 526	1.215b $\pm$ 429	1.279b $\pm$ 356
<b>Fenoles volátiles</b>					
4-Etilguayacol	ns	ns	318 $\pm$ 301	318 $\pm$ 273	295 $\pm$ 255
4-Etilfenol	ns	ns	1.866 $\pm$ 656	1.990 $\pm$ 682	1.790 $\pm$ 630
4-Vinilguayacol	ns	**	443ab $\pm$ 277	614b $\pm$ 385	313a $\pm$ 186
4-Etilcatecol	ns	**	768a $\pm$ 604	844a $\pm$ 580	2.227b $\pm$ 2.034
<b>Alcoholes</b>					
3-Metil-3-butenol	ns	ns	32 $\pm$ 6	34 $\pm$ 9	29 $\pm$ 10
1-Pentanol	ns	***	100a $\pm$ 27	119b $\pm$ 27	114b $\pm$ 30
3-Metil-2-butenol	ns	***	51a $\pm$ 14	61b $\pm$ 15	50a $\pm$ 18
3-Metil-1-pentanol	ns	ns	30 $\pm$ 12	33 $\pm$ 12	31 $\pm$ 12
Hexanol	ns	**	4.200a $\pm$ 680	4.799b $\pm$ 601	4.330ab $\pm$ 709
<i>t</i> -3-Hexenol	ns	ns	37 $\pm$ 8	41 $\pm$ 9	37 $\pm$ 8
<i>c</i> -3-Hexenol	ns	***	326b $\pm$ 143	279b $\pm$ 163	162a $\pm$ 77
Alcohol bencílico	ns	**	278a $\pm$ 97	313b $\pm$ 116	276a $\pm$ 98
<b>Ésteres de etilo</b>					
Propionato	ns	***	409a $\pm$ 210	640ab $\pm$ 342	916b $\pm$ 598
Butirato	ns	***	214b $\pm$ 66	129a $\pm$ 64	115a $\pm$ 54
2-Metilbutirato	ns	ns	256 $\pm$ 12	30 $\pm$ 11	22 $\pm$ 9
Hexanoato	ns	*	154b $\pm$ 60	140ab $\pm$ 67	110a $\pm$ 45
Octanoato	ns	**	358b $\pm$ 105	302b $\pm$ 86	260a $\pm$ 77

Tabla 6.3.1. (Cont.)

	Int.	Sig.	1 Mes	6 Meses	12 Meses
3-Hidroxibutirato	ns	ns	54 ± 27	54 ± 32	49 ± 31
4-Hidroxibutirato <sup>2</sup>	ns	***	538b ± 211	435ab ± 177	308a ± 86
<b>Acetatos</b>					
Butilo	ns	***	43b ± 10	37ab ± 14	32a ± 11
Isoamilo	ns	***	393b ± 198	343b ± 124	277a ± 113
2-Feniletilo	ns	**	119b ± 83	162c ± 143	88a ± 48
<b>Otros</b>					
3-Etoxi-1-propanol	ns	***	805b ± 260	719b ± 289	446a ± 319
γ-Butirolactona	ns	***	1.317a ± 712	2.392b ± 1.598	1.440a ± 487
Metionol	ns	ns	741 ± 399	661 ± 324	466 ± 239

(1): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (2): cuantificado como 3-hidroxibutirato de etilo; LC: Límite de cuantificación; Int: interacción tiempo x temperatura; Sig: significación con el factor tiempo; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%; Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes

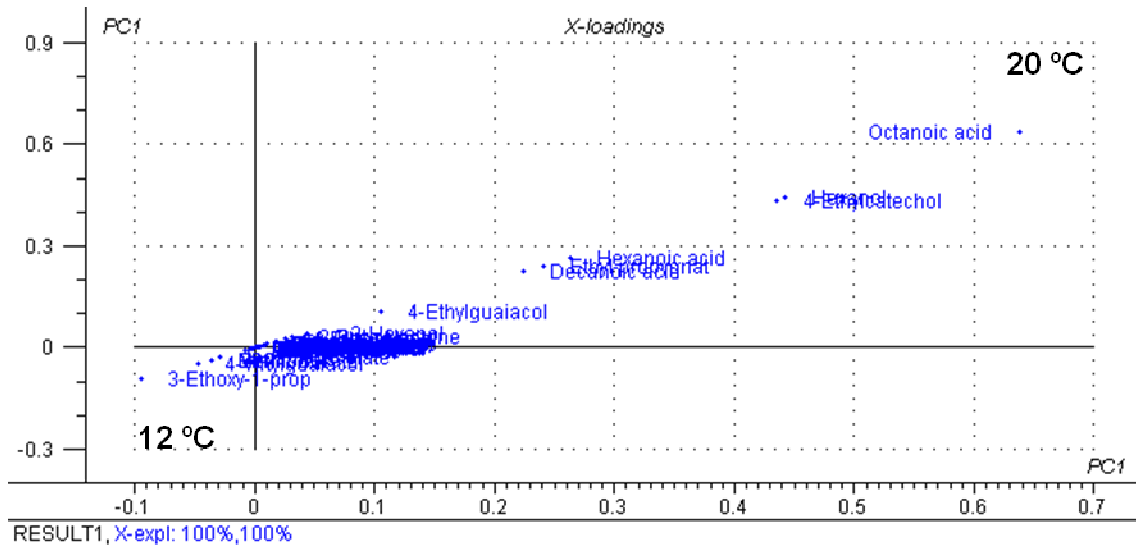
Con carácter general, se observó una disminución del contenido de ésteres a lo largo del almacenamiento, con excepción del propionato de etilo, éster de carácter frutal, que aumentó su concentración con el tiempo, y el 3-hidroxibutirato de etilo, que no experimentó variación alguna en el periodo estudiado. Los ésteres de acetato disminuyeron durante la conservación, con excepción del acetato de 2-feniletilo que aumentó su concentración tras seis meses en botella, disminuyendo al final del año.

Otros compuestos analizados, como el 3-etoxi-1-propanol, disminuyeron durante el almacenamiento, mientras que la γ-butirolactona alcanzó un máximo de concentración tras seis meses de almacenamiento.

La influencia de condiciones de conservación se evaluó también mediante ASCA. Para ello, se construyeron las matrices correspondientes a los dos factores estudiados: temperatura y tiempo y la interacción.

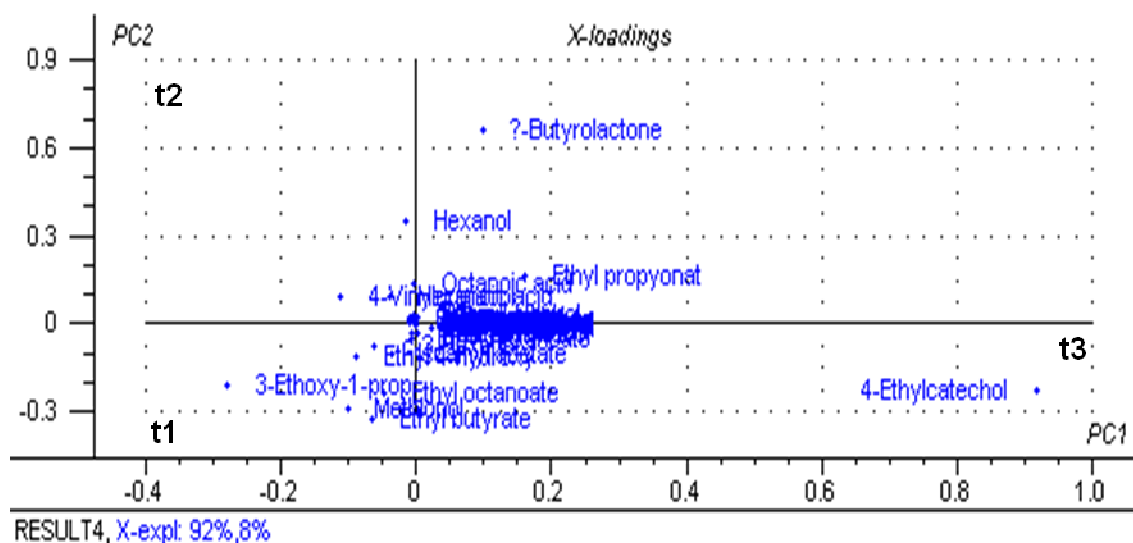
En la Figura 6.3.2 se muestran los resultados correspondientes al efecto de la temperatura. Las variables con mayores pesos en esta componente principal fueron ácido octanoico (0,638), hexanol (0,442), 4-EC (0,435), ácido hexanoico (0,263), propionato de etilo (0,242), ácido decanoico (0,224), 4-EG (0,105) y 3-etoxi-1-propanol (-0,094). La conservación de las sidras a 20 °C dio

lugar a un aumento de ácido octanoico, hexanol y 4-EC, mientras que el mantenimiento de las muestras a 12 °C favorece el incremento de la concentración de 3-etoxi-1-propanol.



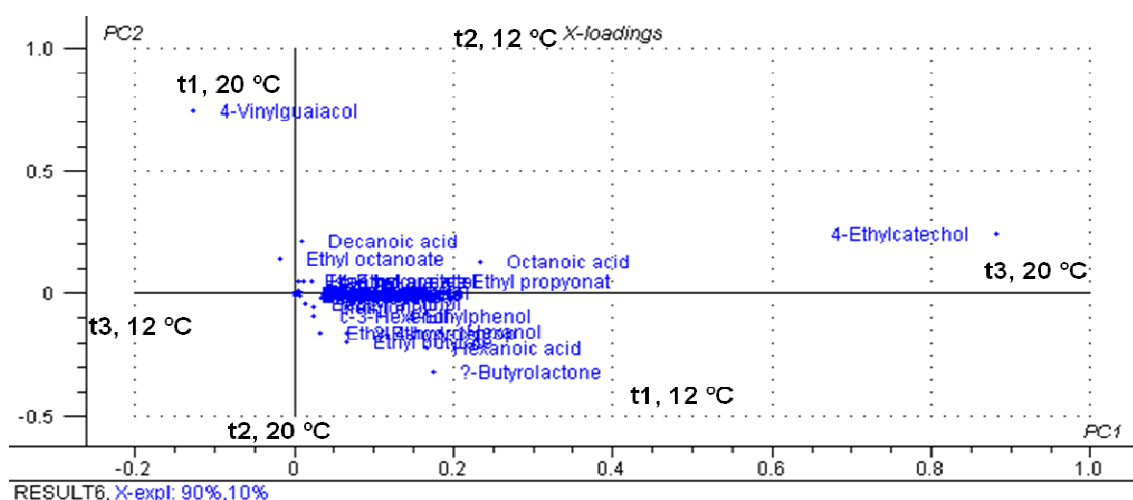
**Figura 6.3.2.** Representación de las variables químicas sobre el componente principal de temperatura.

La influencia del tiempo sobre la composición aromática cuantitativa se representa en la Figura 6.3.3. Se obtuvieron dos componentes principales al disponer de tres niveles para este factor. En este caso, la primera componente principal, que explicó el 92% de la varianza, aumentó con el tiempo de conservación. Las variables químicas asociadas con esta componente fueron 4-EC (0,918), propionato de etilo (0,161), metionol (-0,102), 4-VG (-0,112) y 3-etoxi-1-propanol (-0,279). La concentración de 4-EC experimentó un notable y significativo incremento al final del periodo estudiado, mientras que la de 3-etoxi-1-propanol disminuyó (Tabla 6.3.1), lo cual es coherente con la relación observada en esta gráfica de cada componente con el tiempo. El resultado que proporciona ASCA nos indica, además, que la composición aromática de la sidra experimentó los mayores cambios a partir de los seis meses de permanencia en botella.



**Figura 6.3.3.** Representación de las variables químicas sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes al tiempo de conservación. t1: 1 mes; t2: seis meses; t3: doce meses.

A diferencia de lo observado mediante análisis de varianza, hay que señalar que el análisis ASCA ha detectado un efecto de interacción entre el tiempo y la temperatura de conservación. Los fenoles volátiles se han visto muy influenciados por el tiempo de permanencia en botella, pero su evolución varía en función de la temperatura (Figura 6.3.4). Así por ejemplo, el 4-VG, se relaciona con tiempos largos de conservación a 12 °C, mientras que el 4-EC lo hace con tiempos prolongados a 20 °C.



**Figura 6.3.4.** Representación de las variables cuantitativas sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes a la interacción entre los factores. t1: un mes; t2: seis meses; t3: doce meses.

### **Perfil olfatométrico de las sidras**

En el análisis olfatométrico se identificaron un total de 49 compuestos (datos no mostrados), de los cuales, los ésteres y acetatos fueron los más abundantes, seguidos de fenoles volátiles, ácidos y alcoholes.

Al no haberse detectado efecto significativo de la temperatura ni en la composición cuantitativa ni a nivel sensorial, se analizaron únicamente las sidras conservadas a 12 °C. En la Tabla 6.3.2 se muestran aquellos compuestos que experimentaron diferencias significativas en el perfil olfatométrico debidas al tiempo en botella.

De manera análoga a lo observado a nivel cuantitativo, componentes como el octanoato de etilo, ácido propanoico, guayacol, 4-EG, hexadecanoato de etilo y dos compuestos no identificados descritos como especiado, frutal, dulce, floral (IRL 1470 y 1477) alcanzaron valores máximos de frecuencia modificada tras seis meses de permanencia en botella.

Por su parte, la intensidad de percepción disminuyó a lo largo del periodo estudiado en el caso del 3-metil-2-butenol, el ácido hexanoico y el *o*-cresol. Lo contrario fue observado para el 2-feniletanol y el sotolón.

**Tabla 6.3.2.** Variación de perfiles olfatométricos en las sidras analizadas.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Identificación	Descripción	Sig.	1 mes			6 meses			12 meses		
					Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo
1299		3-Metil-2-butenol	Ahumado, tostado	***	55	72	43	48	61	0	32	52	0
1440	1190	Octanoato de etilo	Frutal, hierba, resinoso	***	10	21	0	16	30	0	9	27	0
1470		ni	Especiado, dulce, floral	**	20	39	0	40	75	0	30	68	0
1477		ni	Especiado, verdura cocida	**	12	26	0	14	55	0	11	24	0
1519	856	Ácido propanoico	Graso, establo	*	25	58	0	28	58	13	27	39	0
1860	1174	Ácido hexanoico	Graso, establo	*	73	80	62	63	79	39	49	54	39
1880	1118	Guayacol	Ahumado, dulce, especiado	***	23	49	7	35	47	26	4	9	0
1929	1175	2-Feniletanol	Rosas	**	71	84	51	75	85	66	85	88	82
2001	1088	o-Cresol	Ahumado	**	16	29	7	14	42	0	2	7	0
2023		ni	Especiado, dulce	***	42	84	0	37	79	0	78	83	73
2047	1294	4-Etilguayacol	Dulce, especiado	***	48	72	11	51	75	11	16	33	7
2183	1476	Eugenol	Especiado, clavo, dulce	**	41	66	22	39	62	18	60	77	53
2210	1095	Sotolón	Curry, especiado	**	60	67	46	70	82	55	77	84	65
2253		Hexadecanoato de etilo	Resinoso, hierba seca	*	11	21	0	16	30	7	4	7	0

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; ni: no identificado; Sig: significación; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%.

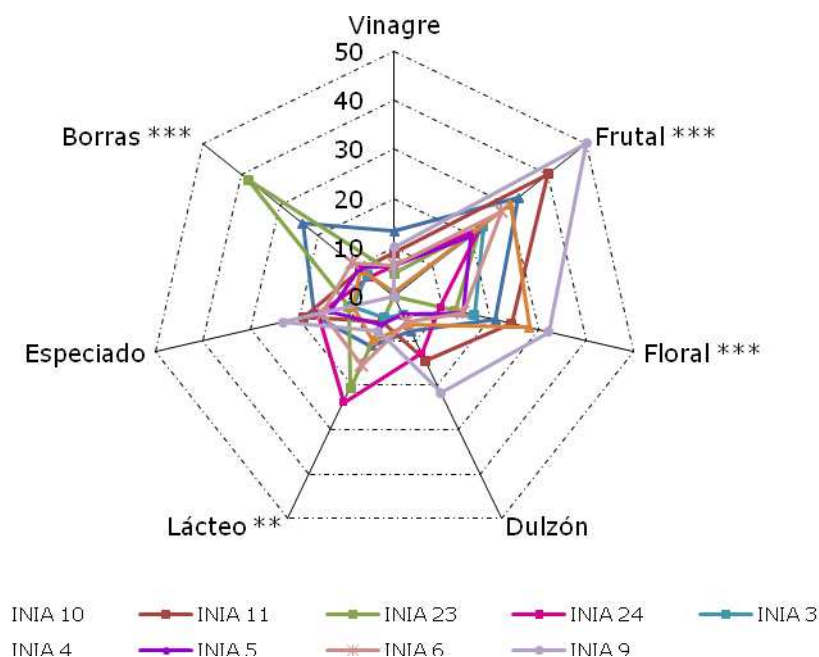


## **6.4. Influencia de la composición aromática en los perfiles sensoriales de la sidra de nueva expresión**

En general, el efecto “catador” fue significativo en todos los atributos. Por ello, para determinar la influencia de los factores de interés (muestras, tiempo o temperatura) hemos utilizado un modelo de efectos aleatorios para el cálculo de varianza, tomando a los catadores como factor. De esta forma, las conclusiones obtenidas a partir de estos análisis sensoriales quedan referidas a aquella población de personas que, con el mismo entrenamiento, muestren una habilidad similar para la evaluación de sidras (Lea *et al.*, 1997). El valor de la F se calculó para todos los atributos dividiendo su media cuadrática por la media cuadrática de la correspondiente interacción.

### **6.4.1. Perfiles sensoriales de sidras de mercado**

Para la medida de los diferentes atributos se emplearon escalas lineales de 9 puntos, en las que se definieron los extremos y el centro. En el análisis sensorial de las sidras se encontraron diferencias significativas entre muestras para los atributos de olor frutal, floral, lácteo y *borras*. Como se puede observar en la Figura 6.4.1, las muestras de referencias 9, 11 y 10 mostraron las mayores intensidades de frutal; la referencia INIA 9 fue la más floral, dulce y especiada del conjunto, mientras que la muestra INIA 23 alcanzó la puntuación más alta para el atributo *borras*, seguida de la INIA 10. Las sidras 23 y 24 fueron descritas como las más lácteas del conjunto. En general, la percepción del olor o aroma a vinagre fue débil o muy débil, a pesar del rango de variación observado en la acidez volátil (Tabla 6.2.1).



**Figura 6.4.1.** Gráfico de araña de los perfiles sensoriales de las sidras de mercado. Las puntuaciones mostradas corresponden a porcentajes de intensidad de percepción. (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*) : significativo al 1%.

#### 6.4.2. Variación de los perfiles sensoriales de la sidra de nueva expresión durante el periodo de conservación en botella

En la Tabla 6.4.2 se muestran las intensidades de percepción promedio de cada uno de los atributos de olor evaluados en sidras de nueva expresión, durante el periodo de conservación.

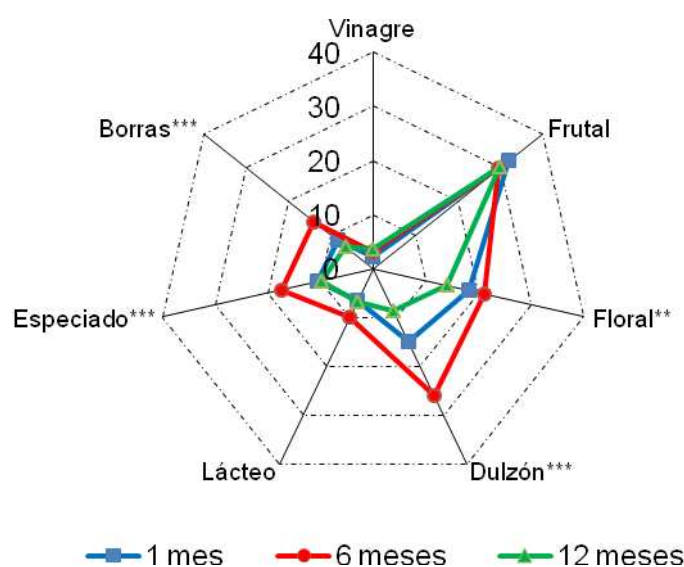
En primer lugar, cabe destacar que no se observó influencia significativa de la temperatura sobre los atributos sensoriales evaluados, mientras que el tiempo de almacenamiento afectó a la percepción de los olores floral, dulzón, especiado y *borras*.

De modo análogo a lo observado entre los datos cuantitativos y olfatométricos, todos los atributos sensoriales mostraron un máximo de percepción a los seis meses de embotellado, con la excepción de frutal (Figura 6.4.2). Dicho máximo fue muy notable en el caso de dulzón y *borras*. Transcurrido un año, las intensidades de percepción de todos los atributos, excepto el frutal, disminuyeron.

**Tabla 6.4.2.** Valores de intensidad promedio (%) de atributos de olor en sidras de nueva expresión en función de las condiciones de conservación.

RefM	t	Lagar	T	Sig	Vinagre	Frutal	Floral	Dulzón	Lácteo	Especiado	Borras
				t	ns	ns	**	***	ns	***	***
				T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
				Int.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
INIA 2A	1	1	12		8	38	27	14	10	16	6
INIA 2B	1	1	20		2	34	21	16	4	13	7
INIA 2A	2	1	12		2	26	17	19	6	12	18
INIA 2B	2	1	20		3	22	19	26	9	13	21
INIA 2A	3	1	12		1	44	21	15	11	17	6
INIA 2B	3	1	20		0	42	19	18	1	19	3
INIA 15	1	2	12		3	38	24	10	6	18	10
INIA 16	1	2	20		1	26	19	17	7	14	12
INIA 15	2	2	12		0	44	19	31	9	22	25
INIA 16	2	2	20		0	23	15	29	15	14	27
INIA 15	3	2	12		0	32	10	13	17	18	19
INIA 16	3	2	20		0	31	11	19	10	18	22
INIA 12	1	3	12		2	23	15	25	5	7	9
INIA 13	1	3	20		2	35	15	24	4	6	11
INIA 12	2	3	12		0	24	25	30	13	19	16
INIA 13	2	3	20		1	42	31	20	12	19	9
INIA 12	3	3	12		2	32	19	8	7	7	2
INIA 13	3	3	20		0	32	16	4	12	10	0
INIA 25	1	4	12		0	50	22	18	8	19	8
INIA 26	1	4	20		0	43	21	9	10	16	13
INIA 25	2	4	12		2	40	23	18	6	21	9
INIA 26	2	4	20		3	31	14	9	10	17	12
INIA 25	3	4	12		3	30	25	17	6	23	11
INIA 26	3	4	20		5	25	10	8	9	15	10
INIA 18	1	5	12		4	32	15	19	7	8	9
INIA 19	1	5	20		4	30	23	21	8	7	8
INIA 18	2	5	12		0	36	29	39	11	20	3
INIA 19	2	5	20		2	20	22	42	11	24	3
INIA 18	3	5	12		0	29	14	12	4	9	6
INIA 19	3	5	20		0	31	12	6	7	16	6
INIA 21	1	6	12		1	20	9	3	4	1	3
INIA 22	1	6	20		2	16	7	4	6	2	2
INIA 21	2	6	12		10	23	16	22	8	11	11
INIA 22	2	6	20		16	27	22	28	10	16	13
INIA 21	3	6	12		6	27	14	10	7	8	6
INIA 22	3	6	20		16	28	6	4	4	9	16

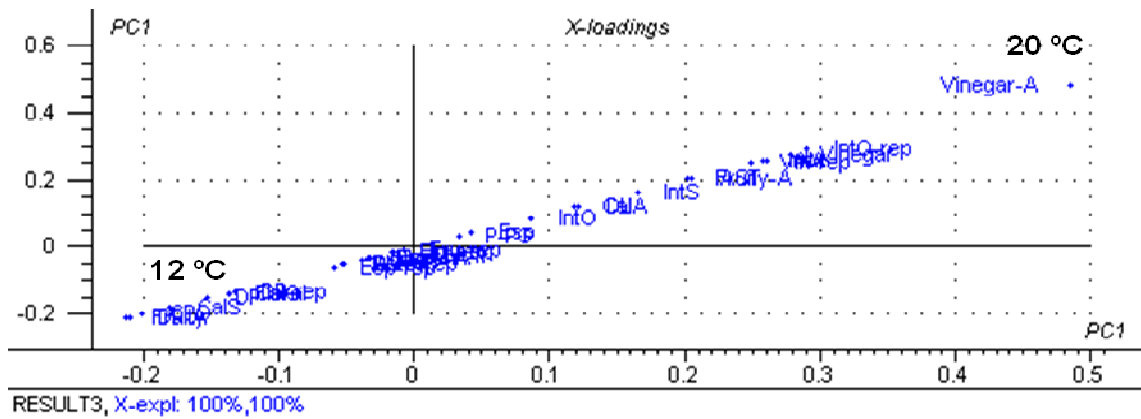
RefM: referencia de la muestra; t: tiempo de conservación (1: un mes; 2: seis meses; 3: 12 meses); T: temperatura; Int.: Interacción; ns: no significativo; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%.



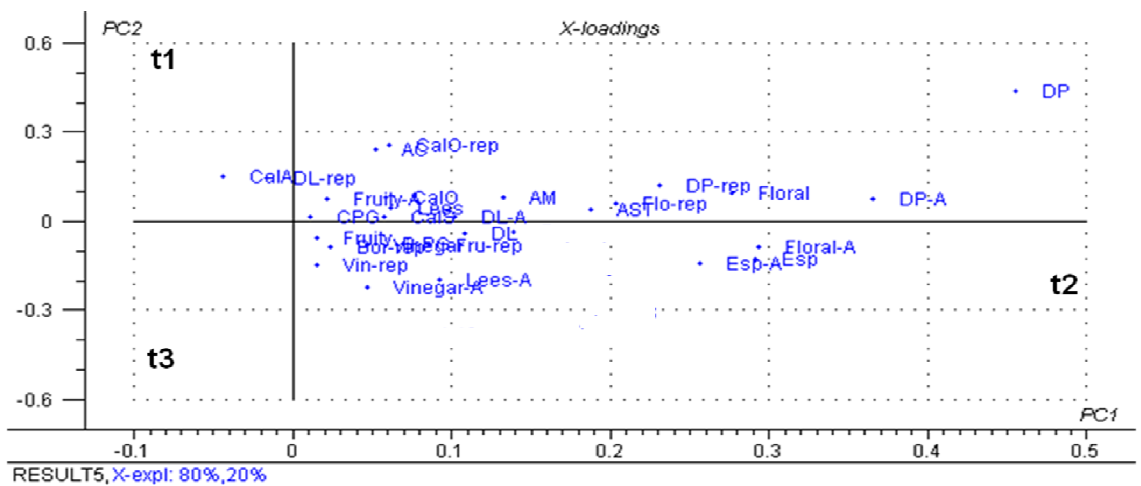
**Figura 6.4.2.** Gráfico de araña de los perfiles sensoriales de las sidras durante el periodo analizado. Las puntuaciones mostradas corresponden a porcentajes de intensidad de percepción. (\*\*): significativo al 5%; (\*\*): significativo al 1%.

La variación experimentada por los atributos sensoriales durante el tiempo de conservación a dos temperaturas fue evaluada mediante la técnica ASCA. De forma análoga a lo explicado en relación con la composición aromática cuantitativa, este método de análisis ha permitido poner de manifiesto la influencia de la temperatura de conservación en la variación de las características organolépticas de las sidras.

En la Figura 6.4.3 se representan los resultados obtenidos con respecto al factor temperatura. Como se puede observar, la intensidad del aroma a vinagre fue mayor en las sidras mantenidas a 20 °C, mientras que la del olor frutal, el aroma dulzón y la calidad post-gusto fueron superiores en las sidras almacenadas a 12 °C.



**Figura 6.4.3.** Representación de los atributos sensoriales sobre el componente principal de temperatura.



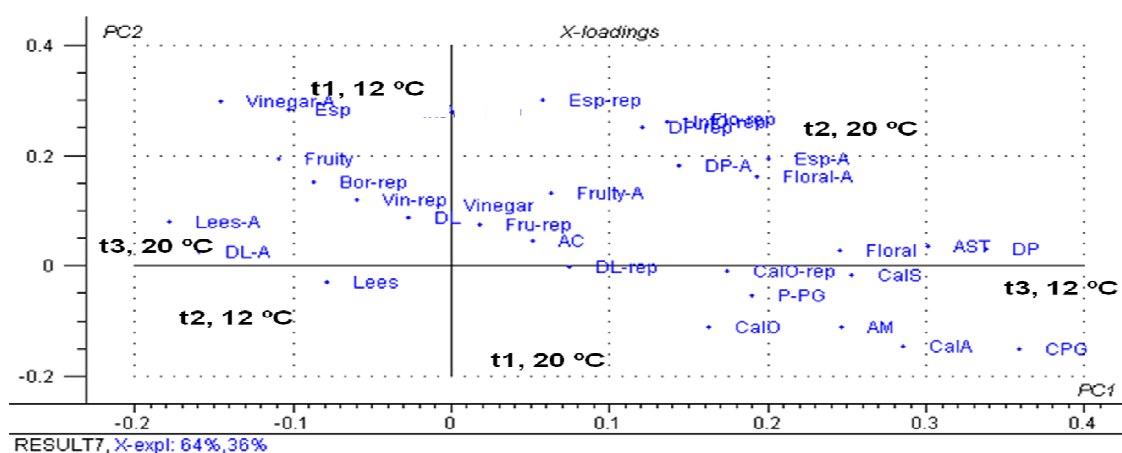
**Figura 6.4.4.** Representación de los atributos sensoriales sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes al tiempo de conservación. t1: un mes; t2: seis meses; t3: doce meses.

La evaluación del tiempo de embotellado se representa en la figura 6.4.4. En esta gráfica se puede comprobar la diferenciación entre los tres puntos de muestreo a lo largo de la primera componente principal (80% de la varianza). Los aromas dulztones se desarrollan más a los seis meses de conservación en botella y, por el contrario, los aromas a vinagre están relacionados con mayores tiempos de conservación.

El diseño factorial de dos factores, temperatura (T) y tiempo (t) de conservación en botella, con dos niveles para la temperatura (12 y 20 °C) y tres para el tiempo (1, 6 y 12 meses), dio origen a seis (N) combinaciones

factoriales para la interacción que fueron tratadas mediante un análisis de componentes principales.

Las dos primeras componentes, de las cinco posibles (N-1), acumularon el 100% de la varianza. Como se puede observar en la Figura 6.4.5, donde se proyectan los *scores* promedio correspondientes a cada una de las seis combinaciones estudiadas junto con las variables sensoriales, se detectó una interacción (t x T) entre ambos factores, ya que la evolución en el tiempo sobre la primera componente principal estuvo condicionada por la temperatura. Así, por ejemplo, los *scores* en la primera componente disminuyen con el tiempo de permanencia en botella a 20 °C, mientras que a 12 °C aumentan.



**Figura 6.4.5.** Representación de los atributos sensoriales sobre el plano formado por las dos componentes principales correspondientes a la interacción entre los factores. t1: un mes; t2: seis meses; t3: doce meses.

La conservación a 20 °C está relacionada con la mayor percepción de aromas a *borras* (lees), vinagre (vinegar) y lácteo (DL-A); por el contrario, la calidad de sabor (Cal-S), el atributo floral, calidad post-gusto (CPG), astringencia (AST) y dulzón (DP) se vinculan más a una conservación a 12° C. Transcurrido un mes, se aprecian diferencias en las percepciones aromáticas en función de la temperatura. Así, por ejemplo, la intensidad aromática (IntA) y de olor (IntO) son más elevadas a 12 °C y, sin embargo, la calidad aromática (CalA) y de olor (CalO) son mayores a 20 °C. A los seis meses se detecta una correlación entre al aroma a *borras* y la sidra conservada a 12 °C que

desaparece posteriormente, mientras que los aromas floral y especiado (Floral-A, Esp-A) se potencian a los seis meses de conservación a 20 °C.

### **6.4.3. Modelos de predicción de atributos sensoriales**

Con el fin de explicar la posible influencia de la composición aromática analizada en las percepciones sensoriales, se han construido diferentes modelos de regresión lineal multivariante sobre componentes principales (PLS-1) utilizando los porcentajes de intensidad de cada uno de los atributos sensoriales y los promedios de las intensidades olfatométricas. Se han incluido para este cálculo las sidras en rama de partida, las sidras de nueva expresión de mercado y las muestras filtradas conservadas a 12 °C, con el fin de dar mayor robustez a los modelos estadísticos.

Se trabajó con una matriz de 31 objetos y 77 variables, obteniéndose tres modelos con elevados coeficientes de correlación correspondientes a los atributos frutal, especiado y calidad aromática (Tabla 6.4.3).

**Tabla 6.4.3.** Características de los modelos de calibración y predicción de atributos sensoriales a partir de variables olfatométricas.

	<b>Nº CP</b>	<b>Pendiente</b>	<b>R</b>	<b>%VE</b>	<b>RMSEP</b>
Frutal	4	0,94	0,97	94	6,51
Especiado	2	0,68	0,83	69	5,62
Calidad aromática	4	0,92	0,96	92	6,32

CP: componentes principales; R: coeficiente de correlación; VE: varianza explicada; RMSEP: Error cuadrático medio de predicción

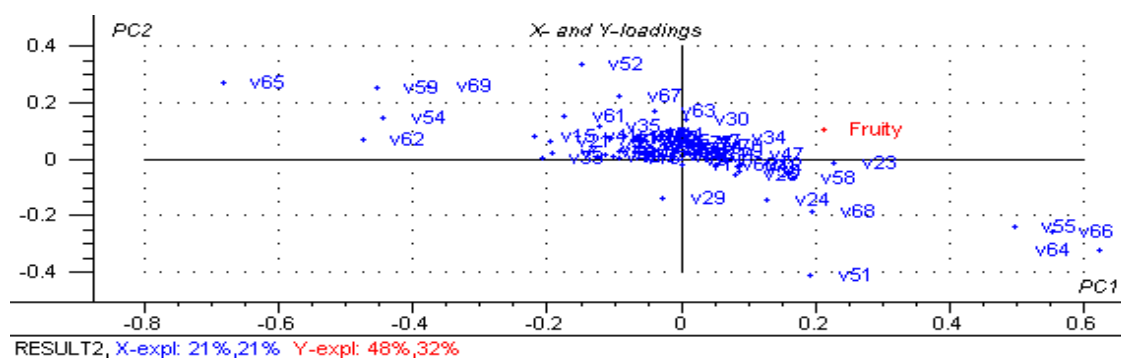
Con respecto al atributo frutal, se obtuvo un modelo de regresión a partir de cuatro componentes principales capaz de explicar un 94% de la varianza de este atributo. En la Figura 6.4.6 se muestran los pesos de las variables olfatométricas en los dos primeros ejes principales, y en la Figura 6.4.7 las proyecciones de las sidras sobre ese plano. Las variables olfatométricas con mayores coeficientes de regresión se recogen en la Tabla 6.4.4.

**Tabla 6.4.4.** Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 del atributo frutal.

Odorantes	Referencia variables	CP1	CP2	Coefficientes de regresión
Metional	v23	0,227	-1,30E-02	0,185
Ácido propanoico	v29	-2,78E-02	-0,138	-0,125
Ácido <i>i</i> -butanoico	v30	7,93E-03	0,142	0,148
$\gamma$ -Butirolactona	v34	6,52E-02	7,47E-02	0,121
Guayacol	v45	-8,67E-02	8,80E-02	8,52E-02
2-Feniletanol	v47	9,06E-02	1,88E-02	7,89E-02
Eugenol	v63	-4,09E-02	0,171	0,130
4-VG	v68	0,196	-0,183	-9,25E-02
Hexadecanoato de etilo	v70	2,73E-02	4,72E-02	8,23E-02

CP: componente principal

En la predicción del frutal participaron de forma positiva compuestos pertenecientes a diversas familias, entre ellos, dos fenoles (guayacol y eugenol) un ácido graso (*i*-butanoico), un alcohol (2-feniletanol), un aldehído (metional), una lactona ( $\gamma$ -butirolactona), y un éster de etilo de cadena larga (hexadecaonato de etilo). El ácido propanoico y el 4-VG fueron los únicos odorantes observados con una contribución negativa a este atributo.

**Figura 6.4.6.** Pesos de las variables olfatométricas sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales del modelo frutal.

En la Figura 6.4.7 se puede apreciar una cierta discriminación de las sidras. En la parte superior de la gráfica se situaron prácticamente todas las muestras comerciales (excepto INIA 23 e INIA 24). Este conjunto de sidras está asociado con variables de carácter especiado como 4-EG (v52), v59 y v69 (LRI 2145 y 2252), o v65 (LRI 2219).





**Tabla 6.4.5.** Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 del atributo especiado.

Odorantes	Referencia variables	CP1	CP2	Coefficiente de regresión
IRL 2023	v51	-0,696	3,65E-02	-0,110
4-EG	v52	0,563	-2,89E-02	8,82E-02
Ácido octanoico	v54	0,105	-0,328	-4,90E-02
Eugenol	v63	0,170	-5,88E-02	3,05E-02
4-EF	v64	-0,456	0,380	1,95E-02
Sotolón	v66	-0,391	0,330	2,49E-02

CP: componente principal; IRL: índice de retención lineal en columna DB<sub>WAX</sub>.

Finalmente, la calidad aromática se relacionó principalmente con los odorantes recogidos en la Tabla 6.4.6.

**Tabla 6.4.6.** Pesos de las variables olfatométricas y sus coeficientes de regresión en el modelo PLS-1 para la calidad aromática.

Odorantes	Referencias variables	CP1	CP2	Coefficiente de regresión
Ácido <i>i</i> -butanoico	v30	-7,63E-02	0,113	5,99E-02
2-Feniletanol	v47	4,77E-02	0,186	4,70E-02
Ácido octanoico	v54	-0,205	0,397	5,54E-02
IRL 2143	v59	-0,328	3,52E-02	-7,71E-02
IRL 2169	v61	-0,177	-0,117	-0,106
Eugenol	v63	-8,55E-02	0,321	0,165
4-EF	v64	0,399	-0,332	-2,50E-02

CP: componente principal; IRL: índice de retención lineal en columna DB<sub>WAX</sub>.

Las variables con mayor contribución a este modelo fueron el eugenol y un odorante descrito como especiado y dulzón (IRL 2169). Participaron de manera positiva dos ácidos grasos y el 2-feniletanol, y negativamente el 4-EF y un compuesto no identificado con carácter dulzón y floral (IRL 2143). Ambos compuestos no identificados (IRL 2143 y 2169) se detectaron con valores de FM superiores al 30% únicamente en las sidras en rama.

Las relaciones observadas en estos modelos entre atributos sensoriales y variables olfatométricas son destacables, y podrían considerarse como el punto de partida de los futuros estudios de reconstitución, imprescindibles para explicar el aroma de la sidra.



**Sidras  
especiales**

**7.1. Introducción**

**7.2. Sidra espumosa**

7.1.1. Muestras

7.1.2. Resultados

**7.3. Sidra de hielo**

7.3.1. Muestras

7.3.2. Resultados



## 7.1. Introducción

Los trabajos de investigación realizados en el campo de los vinos espumosos y cavas han sido abundantes a lo largo de los últimos años (Pozo-Bayón *et al.*, 2009; Torresi *et al.*, 2011). Se ha estudiado la influencia de diferentes factores sobre la fracción aromática de este producto, como la levadura utilizada y las características del vino base (Torrens *et al.* 2008) o el suelo, los estados de maduración, y las variedades utilizadas en su elaboración (Coelho *et al.* 2009), los cambios que tienen lugar como consecuencia de la segunda fermentación o la crianza sobre lías (Hidalgo *et al.*; 2004 Pozo-Bayón *et al.*; 2003; Riu-Aumatell *et al.*; 2006), las condiciones de envejecimiento (Escudero *et al.*, 2000), el periodo de tiempo en botella (Torchio *et al.*, 2012), o el método de extracción en el análisis de los compuestos volátiles (Bosch Fusté *et al.*, 2007).

Torrens *et al.* (2010), han estudiado la composición volátil y olfatométrica, así como las características sensoriales de los vinos base y sus correspondientes vinos espumosos, resultando el perfil sensorial de los vinos espumosos mucho más complejo que el del vino base. Campo *et al.* (2008) identificaron algunos compuestos aromáticos potencialmente responsables de las características de estos vinos especiales.

En el ámbito de la sidra, son pocos los trabajos realizados hasta el momento. Así, en lo referente al aroma, Suárez Valles *et al.* (2008) evaluaron la capacidad de un grupo de levaduras para llevar a cabo la segunda fermentación de sidras espumosas. La cepa de levadura influyó significativamente sobre el contenido de glicerina, acetaldehído, acetato de etilo, metanol, propanol, *i*-butanol y 2-feniletanol. Rodríguez Madrera *et al.* (2008) analizaron la influencia de la cepa de levadura (*Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*) y el tiempo de envejecimiento (hasta 15 meses sobre lías) en la fracción volátil de la sidra espumosa elaborada de acuerdo con el método tradicional. El tiempo de envejecimiento afectó a la concentración de acetaldehído, acetato, lactato, hexanoato y octanoato de etilo, entre otros, análogamente a lo descrito en cavas (Hidalgo *et al.*, 2004). La

concentración de metanol, 2-feniletanol, lactato de etilo y octanoato de etilo fue superior en las sidras elaboradas con la cepa de levadura *S. bayanus*.

Con respecto a la sidra de hielo, y hasta donde alcanza nuestra información, en la única referencia encontrada (Radu, 1999) se evaluaron diferentes métodos de concentración (congelación de manzana, mosto y sidra) y su influencia sobre la calidad del producto, utilizando las variedades Cortland y McIntosh.

En el campo de los vinos de hielo se ha estudiado su composición y características sensoriales (Cliff *et al.*, 2002; Nurgel *et al.*, 2004), el impacto sobre estos aspectos de factores tales como la cosecha y la región vitícola (Soleas y Pickering, 2007), la cepa de levadura y el método de inoculación (Erasmus *et al.*, 2004; Kontkanen *et al.*, 2004). En cuanto al aroma, Setkova *et al.* (2007) pusieron de manifiesto la existencia de perfiles volátiles y sensoriales capaces de discriminar significativamente las muestras en función de la zona de elaboración, y Bowen y Reynolds (2012) identificaron mediante olfatometría aromas potencialmente asociados al tipo de elaboración en vinos de las variedades Riesling y Vidal.

En este capítulo se aborda una descripción preliminar del aroma de las sidras espumosas y de hielo existentes en el mercado asturiano, con el fin de observar la influencia de dos tipos de elaboración especial sobre la estructura aromática de la sidra.

## **7.2. Sidra espumosa**

### **7.2.1. Muestras**

Se analizaron seis sidras espumosas pertenecientes a las cosechas 2009, 2010 y 2011. Las muestras fueron conservadas a 12 °C hasta su análisis químico y sensorial. Cinco de ellas se elaboraron bajo el reglamento de la Denominación de Origen Protegida “Sidra de Asturias”.

## 7.2.2. Resultados

### Parámetros enológicos

La Tabla 7.2.1 proporciona información detallada sobre las características analíticas y tecnológicas de las sidras.

El método de elaboración más utilizado en Asturias es el de segunda fermentación en botella. Las muestras obtenidas por este método alcanzaron grados alcohólicos superiores a 7% (v/v); por su parte, las sidras procedentes del sistema *Granvas* presentaron contenidos mayores de azúcares residuales.

**Tabla 7.2.1.** Parámetros enológicos de las sidras analizadas.

	Sig.	E1	E2 <sup>(a)</sup>	E3	E4	E5	E6
Grado alcohólico (% v/v)	***	7,38	7,74	6,77	6,52	7,63	7,34
pH	ns	3,71	3,78	3,88	3,78	3,81	3,88
Acidez volátil (g ác. acético/L)	ns	0,65	1,21	1,27	1,04	0,69	1,48
Acidez total (g ác. sulfúrico/L)	ns	3,24	4,05	3,28	3,20	2,88	3,22
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	ns	67	14	51	26	13	87
Acido láctico (g/L)	ns	6,0	7,6	5,4	5,9	6,1	5,0
Glicerol (g/L)	ns	4,9	4,1	1,4	2,8	4,0	2,3
Sorbitol (g/L)	ns	9,0	8,0	6,4	6,4	9,3	6,2
Sobrepresión (Bar, 20° C)	ns	4,1	5,6	4,6	3,0	4,0	5,3
Glucosa (g/L)	ns	nd	2,6	6,3	5,1	nd	nd
Fructosa (g/L)	ns	nd	2,8	7,0	6,4	nd	nd
Método de elaboración		1	1	2	2	1	1

nd: no detectado; 1: método *Champenoise*; 2: método *Granvas*; Sig: significación; ns: no significativo; (\*\*): significativo al 1%; (a): no DOP.

### Perfil cuantitativo de las sidras

La Tabla 7.2.2 resume las concentraciones de compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios encontrados en las sidras espumosas analizadas.

Análogamente a lo observado en los capítulos anteriores, la fracción correspondiente a los componentes mayoritarios se caracterizó por la presencia de altos niveles de alcoholes amílicos y lactato de etilo, con valores promedio de 168 y 210 mg/L, respectivamente.



Tabla 7.2.2. Composición volátil de las sidras analizadas.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	Media	DS	Máx.	Mín.
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>										
Acetaldehído	nd	nd	nd	nd	nd	10	10		10	nd
Acetato de etilo	53b	77d	39a	64c	44a	74d	58	15	77	39
Metanol	85f	125g	31a	35b	41c	47d	61	37	125	31
2-Butanol	nd	nd	nd	nd	nd	8	8		8	nd
1-Propanol	20b	38d	28c	21b	16a	62e	31	17	62	16
<i>i</i> -Butanol	27b	43c	68e	26ab	23a	49d	39	17	68	23
Alcohol alílico	nd	nd	9	nd	nd	nd	9		9	nd
1-Butanol	4d	4c	2a	4d	4c	3b	3	1	4	2
Alcoholes amílicos <sup>1</sup>	130a	216c	201c	150b	157b	157b	168	33	216	130
Acetoína	27c	57d	5a	4a	16b	3a	19	21	57	3
Lactato de etilo	252d	251d	185b	217c	225c	130a	210	46	252	130
2-Feniletanol	84d	107e	20a	15a	43c	27b	50	38	107	15
<b>Volátiles minoritarios (µg/L)</b>										
<b>Ácidos grasos</b>										
Hexanoico	3.410a	3.120a	5.701c	7.416e	6.426d	4.457b	5.088	1.713	7.416	3.120
Octanoico	4.444b	3.612a	5.846d	6.371f	5.271c	5.070c	5.102	985	6.371	3.612
Decanoico	1.368d	775b	665a	653a	1.041c	1.290d	965	315	1.368	653
<b>Fenoles volátiles</b>										
4-Etilguayacol	747b	1.235d	827b	996c	991c	219a	836	346	1.235	219
4-Etilfenol	1.868a	6.719c	1.792a	2.032a	3.933b	1.847a	3.032	1.985	6.719	1.792
4-Vinilguayacol	409a	379a	889b	405a	1413d	1.310c	801	475	1.413	379
4-Etilcatecol	934a	13.871e	2.003b	4.115d	18.425f	3.342c	7.115	7.227	18.425	934

Tabla 7.2.2. (Cont.)

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	Media	DS	Máx.	Mín.
<b>Alcoholes</b>										
3-Metil-3-butenol	27a	28a	30a	33b	35c	41d	32	5	41	27
1-Pentanol	186d	143c	90a	124b	140c	125b	135	32	186	90
3-Metil-2-butenol	38a	50c	42a	46b	51c	62d	48	8	62	38
3-Metil-1-pentanol	94e	48c	20a	21ab	51d	24b	43	29	94	20
Hexanol	5.775c	4.150a	6.481d	8.157e	7.835e	5.069b	6.244	1.564	8.157	4.150
<i>t</i> -3-Hexenol	85c	50b	40a	41a	48b	41a	51	17	85	40
<i>c</i> -3-Hexenol	183a	585d	580d	446c	286b	304b	398	166	585	183
Alcohol bencílico	174b	315d	141a	268c	279c	455e	272	112	455	141
<b>Esteres de etilo</b>										
Propionato	667e	260c	212b	473d	170a	992f	462	320	992	170
Butirato	197d	48a	146b	294f	263e	168c	186	88	294	48
2-Metilbutirato	42e	16a	21b	26c	28d	21b	26	9	42	16
Hexanoato	205bc	68a	215c	297d	375e	194b	226	104	375	68
Octanoato	141b	74a	144b	136b	212c	141b	141	44	212	74
3-Hidroxibutirato	87b	36a	114c	85b	87b	124d	89	31	124	36
4-Hidroxibutirato <sup>2</sup>	308a	328a	857d	447b	710c	1.020e	612	296	1.020	308
<b>Acetatos</b>										
Propilo	427c	381b	363b	169a	193a	185a	286	116	427	169
Butilo	47b	nd	nd	nd	29a	47b	41	10	47	nd
Isoamilo	443f	99a	325c	262b	403e	355d	315	123	443	99
2-Feniletilo	293e	92d	21a	17a	47c	33b	84	106	293	17
<b>Otros</b>										
3-Etoxi-1-propanol	116a	1.133d	389c	123a	337b	357bc	409	374	1.133	116
$\gamma$ -Butirolactona	1.745a	2.155b	2.563c	3.985e	3.035d	2.076b	2.593	814	3.985	1.745
Metionol	612b	885c	591b	369a	914c	384a	626	235	914	369

(1): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (2): cuantificado como 3-hidroxibutirato de etilo; nd: no detectado; Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (test de Duncan,  $\alpha=0.05$ )

El metanol, *i*-butanol y 1-propanol se encontraron en concentraciones similares a las observadas en otros tipos de sidras, independientemente de su origen y forma de elaboración. En el caso del metanol, las sidras obtenidas utilizando el método *Granvas* presentaron concentraciones menores.

En la fracción volátil minoritaria cabe destacar, de nuevo, los altos contenidos de fenoles volátiles y ácidos grasos (33 y 31% respectivamente), además de la  $\gamma$ -butirolactona. Destacaron por sus concentraciones el 4-EF (del orden de 3 mg/L) y el 4-EC (en torno a 7 mg/L), siendo las muestras E2 y E5 las que presentaron las mayores cantidades de ambos. La muestra E2 presentó, además, el mayor nivel de 4-EG, y la E5 de 4-VG, lo que convierte a estas sidras en las más fenólicas de las seis estudiadas.

Entre los ácidos grasos analizados, cabe destacar los ácidos hexanoico y octanoico, que presentaron concentraciones en el entorno de 5 mg/L. La sidra E4 presentó los valores máximos, muy superiores a los detectados para el ácido decanoico.

Los alcoholes constituyeron el 20% de los volátiles minoritarios. El hexanol sigue siendo el más importante, con contenidos en el entorno de 6 mg/L, ligeramente superiores a los detectados en otras sidras. Salvo en el caso del hexanol y del *c*-3-hexenol, se ha observado con carácter general que el resto de alcoholes alcanza concentraciones superiores en las sidras elaboradas con el método *Champenoise*.

Por su parte, los ésteres de etilo y los acetatos representaron el 7% de la fracción volátil minoritaria analizada. En lo que respecta a los ésteres de etilo, los niveles de concentración más altos fueron los correspondientes a 4-hidroxibutirato y propionato de etilo (E6). El éster minoritario fue el 2-metilbutirato, con concentraciones promedio de 26  $\mu$ g/L. El acetato de butilo solo fue detectado en el 50% de las muestras, mientras que el acetato de propilo alcanzó concentraciones más elevadas en estas sidras que en las sidras tradicionales anteriormente estudiadas.

En el caso del 3-etoxi-1-propanol, se encontraron concentraciones mayores en las sidras espumosas que en las sidras tradicionales. Por su parte,

la  $\gamma$ -butirolactona y el metionol alcanzaron concentraciones promedio similares a las descritas anteriormente.

### ***Perfil olfatométrico de las sidras***

Los resultados obtenidos para el análisis olfatométrico se muestran en la Tabla 7.2.3, en la que se relacionan 34 odorantes diferentes, de los cuales dos no han sido identificados (IRL 2153: ahumado, cuero, dulce e IRL 2305: vegetal, floral).

El grupo de odorantes con FM promedio  $\geq 50$  incluye, entre otros, alcoholes amílicos, 2-feniletanol, ácidos grasos y fenoles volátiles. Destaca en estas muestras el sotolón, que alcanzó el valor más elevado de frecuencia modificada (83%), seguido del 4-EG (80%) y el 2-feniletanol (78%). Todos los odorantes incluidos en este grupo son también detectados con frecuencias modificadas promedio superiores a 50% en las sidras tradicionales. Ninguno de estos compuestos aportó diferencias significativas entre sidras.

El segundo grupo lo integran 20 odorantes con FM promedio inferiores a 48%, entre los que se encontraron ésteres de etilo y acetatos, ácidos y fenoles volátiles. El 50% de estos odorantes no se percibió en alguna de las muestras analizadas.

El ácido acético alcanzó el valor más alto de frecuencia modificada (48%), seguido del alcohol bencílico (42%), el 3-hidroxibutirato de etilo y el ácido decanoico (37%). En la situación opuesta se encuentran un compuesto no identificado (IRL 2305, 13%), acetato de isoamilo (14%) y guayacol (15%). La mayoría de los ésteres de etilo y acetatos fueron detectados en todas las muestras, exceptuando el octanoato de etilo, que sólo se percibió en el 50%, y el acetato de isoamilo, ausente en la muestra E2, que presentó la menor concentración de este compuesto (Tabla 7.2.2). Entre los ácidos, cabe resaltar que el decanoico se identificó en todas y cada una de las muestras, al contrario de lo que ocurrió con el resto (acético, propanoico y butanoico).

**Tabla 7.2.3.** Perfiles olfatométricos de las sidras espumosas analizadas.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	E1	E2	E3	E4	E5	E6	Media	Sig.
<i>FM promedio ≥ 50%</i>											
1074	805	Frutal, dulce, manzana	2-Metilbutirato de etilo	66	66	61	66	61	37	59	ns
1217	753	Tipo alcoholes superiores	Alcoholes amílicos	57	65	61	58	74	70	64	ns
1294	983	Setas	1-Octen-3-ona	58	76	74	72	71	51	67	ns
1383	887	Floral, geranio	<i>t</i> -3-Hexenol	74	62	29	39	52	52	51	ns
1635	954	Rancio, barniz	$\gamma$ -Butirolactona	72	75	81	79	70	75	75	ns
1681		Queso, rancio	Acido 2-metilbutanoico	81	76	75	60	79	70	73	ns
1735	1013	Vegetales cocidos, azufrado	Metionol	51	51	60	57	59	71	58	ns
1837	1267	Compota, floral	Acetato de 2-feniletilo	63	63	73	67	62	53	64	ns
1860	1174	Graso, establo	Acido hexanoico	57	66	76	73	70	70	68	ns
1929	1175	Rosas	2-Feniletanol	81	79	83	74	80	70	78	ns
2047	1294	Especiado, dulce	4-Etilguayacol	84	83	84	71	81	77	80	ns
2078	1358	Graso, establo, especiado	Acido octanoico	81	62	47	66	63	58	63	ns
2194	1165	Cuero, establo	4-Etilfenol	81	83	84	73	80	59	76	ns
2210	1095	Curry, ahumado, especiado	Sotolón	82	84	83	85	88	77	83	ns
<i>FM promedio &lt; 50%</i>											
905	719	Frutal	Propionato de etilo	9	39	11	29	7	11	18	ns
931	721	Frutal	Acetato de propilo	44	37	37	26	37	37	36	ns
1057	804	Frutal	Butirato de etilo	33	15	22	49	26	21	28	ns
1144	879	Frutal, plátano	Acetato de isoamilo	7	0	12	18	11	35	14	ns
1240	1186	Fruta madura	Hexanoato de etilo	15	26	37	26	47	63	36	**
1404	867	Floral, dulce	<i>c</i> -3-Hexenol	25	38	7	34	0	0	17	*
1440	1190	Frutal, hierba, resinoso	Octanoato de etilo	26	0	0	46	22	0	16	***
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Acido acético	0	54	42	75	47	72	48	***
1466	908	Vegetales cocidos, polvo, rancio	Metional	58	47	9	22	11	18	28	**
1494	957	Frutal, floral	3-Hidroxibutirato de etilo	11	53	18	26	67	47	37	**
1519	856	Graso, establo	Acido propanoico	0	49	7	7	7	56	21	***
1567	966	Lácteo, queso azul	Acido butanoico	39	15	7	18	0	15	16	*
1880	1118	Ahumado, especiado, dulce	Guayacol	0	29	11	18	21	9	15	ns
1903	1071	Frutal, floral, dulce	Alcohol bencílico	34	34	52	55	52	26	42	ns
2100	1123	Cuero, establo	<i>p</i> -Cresol	0	11	27	37	24	41	23	ns

Tabla 7.2.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	E1	E2	E3	E4	E5	E6	Media	Sig.
2153		Ahumado, cuero, dulce	ni	26	21	34	46	48	21	33	ns
2171	1476	Especiado, dulce, establo	$\gamma$ -Decalactona	32	0	0	24	0	53	18	***
2246	1279	Ahumado, especiado	4-Vinilguayacol	11	29	26	59	21	47	32	*
2285	1451	Graso, establo	Acido decanoico	21	55	21	7	67	53	37	**
2305		Vegetal, floral	ni	7	13	0	0	24	37	13	ns

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; ni: no identificado; Sig; significación; ns: no significativo; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%; a: tentativamente identificado.

De acuerdo con el análisis ANOVA, solo algunos de los compuestos con FM < 48% fueron capaces de diferenciar las muestras analizadas (Tabla 7.2.3), como los ácidos acético, propanoico, butanoico y decanoico, los ésteres de etilo, hexanoato, octanoato y 3-hidroxi-butirato, el *c*-3-hexenol, el metional, la  $\gamma$ -decalactona y el 4-VG. Todos ellos, exceptuando el ácido acético, el 3-hidroxi-butirato de etilo y la  $\gamma$ -decalactona, resultaron ser también discriminantes entre sidras de nueva expresión.

### 7.3. Sidra de hielo

#### 7.3.1. Muestras

Se analizaron tres sidras de hielo elaboradas en lagares asturianos, empleando como método de concentración la crioextracción. La fermentación y crianza se llevaron a cabo en toneles de acero y/o madera. En todos los casos se empleó manzana asturiana.

#### 7.3.2. Resultados

##### *Parámetros enológicos*

En la Tabla 7.3.1 se resumen los parámetros enológicos de las sidras de hielo estudiadas. Se trata de bebidas con una elevada concentración de azúcares y con un grado alcohólico promedio de 11,04 % (v/v).

Los niveles de azúcar residual (glucosa + fructosa) en estas muestras fueron elevados, así como la acidez total en el caso de la muestra SH1.

**Tabla 7.3.1.** Composición química de las sidras de hielo analizadas.

	SH1	SH2	SH3	Media	DS
Grado alcohólico (% v/v)	9,80	11,22	12,11	11,04	1,17
pH	3,65	4,02	4,27	3,98	0,31
Acidez volátil (g ác. acético/L)	1,44	0,60	0,89	0,98	0,43
Acidez total (g ác. sulfúrico/L)	12,25	4,40	3,49	6,71	4,82
Acido láctico (g/L)	3,7	5,6	5,6	5,0	1,1
Acido málico	9,0	1,4	< 0,3	3,48	4,79
Glicerol (g/L)	9,7	6,9	7,7	8,1	1,4
Sorbitol (g/L)	19,8	22,6	7,1	16,5	8,3
Glucosa (g/L)	43,6	5,7	11,9	20,4	20,3
Fructosa (g/L)	174,3	52,5	49,0	91,9	71,4

DS: desviación estándar

Cabe destacar que las tres sidras tienen ácido málico, residual en el caso de la sidra SH3, pero en grandes cantidades en la muestra SH1, poniendo de manifiesto diferentes fases en el proceso de la transformación maloláctica.

### **Perfil cuantitativo de las sidras**

La Tabla 7.3.2 muestra las concentraciones promedio de los volátiles mayoritarios y minoritarios encontradas en las sidras de hielo analizadas.

**Tabla 7.3.2.** Composición volátil de las sidras de hielo analizadas.

	SH1	SH2	SH3	Media	DS
<b>Volátiles mayoritarios (mg/L)</b>					
Acetaldehído	43c	26b	20a	30	12
Acetato de etilo	171c	82b	38a	97	68
Metanol	289b	149a	154a	197	79
2-Butanol	nd	nd	nd		
1-Propanol	25c	23b	16a	22	5
<i>i</i> -Butanol	21b	39c	16a	25	12
Alcohol alílico	nd	nd	nd		
1-Butanol	18c	11b	8a	12	5
Alcoholes amílicos <sup>1</sup>	90a	151c	113b	118	31
Acetoína	7b	33c	4a	15	16
Lactato de etilo	326c	143b	74a	181	130
2-Feniletanol	6a	27c	10b	14	11
<b>Volátiles minoritarios (µg/L)</b>					
<b>Ácidos grasos</b>					
Hexanoico	4.513c	1.585a	3.385b	3.161	1.477
Octanoico	1.511a	1.635a	4.586b	2.577	1.741
Decanoico	700a	658a	1.699b	1.019	589
<b>Fenoles Volátiles</b>					
4-Etilguayacol	287c	121b	73a	160	112
4-Etilfenol	1.668b	843a	2.148c	1.553	660
4-Vinilguayacol	1.202c	681b	536a	806	350
4-Etilcatecol	313a	3.371b	252a	1.312	1.783



Tabla 7.3.2. (Cont.)

	SH1	SH2	SH3	Media	DS
<b>Alcoholes</b>					
3-Metil-3-butenol	56c	67b	19a	47	25
1-Pentanol	373c	304b	94a	257	145
3-Metil-2-butenol	33a	73b	79c	62	25
3-Metil-1-pentanol	21a	26b	28b	25	3
Hexanol	9.828c	4.759a	6.028b	6.872	2.638
t-3-Hexenol	110c	50b	36a	65	40
c-3-Hexenol	375c	184b	102a	220	140
Bencílico	114a	271b	332c	239	113
<b>Ésteres de etilo</b>					
Propionato	150b	114a	105a	123	24
Butirato	325c	209b	143a	226	92
2-Metilbutirato	124c	51b	17a	64	55
Hexanoato	358b	96a	103a	186	150
Octanoato	166c	121b	100a	129	34
3-Hidroxi butirato	676c	108a	187b	324	308
4-Hidroxi butirato <sup>2</sup>	1.898a	2.890b	2.753b	2.514	537
<b>Acetatos</b>					
Propilo	148c	134b	57a	113	49
Butilo	56a	60a	140b	85	47
Isoamilo	112a	144b	272c	176	84
2-Feniletilo	<LC	<LC	67	22	39
<b>Otros</b>					
3-Etoxi-1-propanol	373a	348a	1.770b	830	814
γ-Butirolactona	7.947c	1.951b	1.197a	3.698	3.698
Metionol	902c	474b	264a	547	325

(1): corresponde a la suma de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol; (2) cuantificado como 3-hidroxiubutirato de etilo; DS: desviación estándar; nd: no detectado; LC: límite de cuantificación; Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

Entre los volátiles mayoritarios, destaca el metanol, con concentraciones promedio de 197 mg/L, muy superiores a los encontrados en las sidras naturales y espumosas. Se detectaron además concentraciones elevadas de lactato de etilo y de alcoholes amílicos. Por el contrario, los niveles de 2-feniletanol fueron inferiores a los descritos en la mayoría de las sidras naturales estudiadas. A diferencia de lo observado en todas las demás muestras, las sidras de hielo presentaron concentraciones de acetaldehído entre 20 y 43 mg/L.

En la fracción volátil minoritaria los alcoholes y los ácidos grasos representaron el mayor porcentaje (30 y un 20% respectivamente), seguidos por los fenoles volátiles (15%) y los ésteres de etilo y acetatos.

Entre los alcoholes destacó el hexanol, con contenidos promedio en torno a los 7 mg/L, seguido del 1-pentanol, el alcohol bencílico y el *c*-3-hexenol.

En lo que respecta a los ácidos grasos, se observaron valores entre 1 y 3 mg/L, presentando el ácido hexanoico la concentración más elevada seguida del octanoico y el decanoico. En cuanto a los fenoles volátiles, los más abundantes fueron el 4-EF y el 4-EC, con concentraciones promedio en torno a 1,5 mg/L, manteniéndose el orden observado en otras sidras: 4-EF  $\approx$  4-EC > 4-VG > 4-EG. Cabe destacar el hecho de que las sidras de hielo resultaron mucho menos fenólicas que las sidras tradicionales.

En el caso de los ésteres de etilo, el 4-hidroxibutirato de etilo fue el éster mayoritario, alcanzando concentraciones un orden de magnitud superior al resto. Estos niveles de 4-hidroxibutirato de etilo resultan ser también superiores a los detectados en sidras tradicionales, en las que su concentración no alcanzó 1 mg/L. En el mismo caso se encontró el 2-metilbutirato de etilo, éster minoritario que alcanzó concentraciones promedio de 64  $\mu$ g/L, superior a las detectadas en las demás sidras estudiadas.

Entre los acetatos, el de isoamilo sigue siendo el mayoritario. Por su parte, el minoritario resultó ser el de 2-feniletilo, presente en concentraciones inferiores al límite de cuantificación (17  $\mu$ g/L) en dos de estas muestras (Tabla 7.3.2).

Otros compuestos analizados como el 3-etoxi-1-propanol y la  $\gamma$ -butirolactona presentaron niveles de concentración muy diferentes en estas sidras, (Tabla 7.3.2). El 3-etoxi-1-propanol se detectó en la referencia SH3 en concentraciones superiores a 1,5 mg/L, cinco veces superior al encontrado en las otras dos muestras y en las sidras naturales estudiadas, pero similar al observado en sidras maduras sobre *borras* y oxígeno. La  $\gamma$ -butirolactona alcanzó valores elevados en la muestra SH1, que fueron significativamente superiores a los encontrados en sidras naturales. Por último, el metionol se

detectó en estas sidras en concentraciones similares a las ya observados en las demás sidras estudiadas.

### ***Perfil olfatométrico de las sidras***

Los resultados del estudio olfatométrico se muestran en la Tabla 7.3.3. Se detectaron un total de 49 picos olfatométricos, de los cuales 11 no han podido ser identificados.

Entre los odorantes identificados, los ácidos grasos, los alcoholes y los fenoles volátiles fueron las familias más relevantes, seguidas de los ésteres de etilo y los acetatos; este perfil difiere ligeramente del encontrado en las sidras naturales.

Entre los odorantes con FM promedio  $\geq 50\%$ , se encuentran compuestos que también fueron detectados con altas frecuencias modificadas en las sidras naturales estudiadas, a excepción del diacetilo, el metional, un compuesto no identificado con IRL 1508 y el guayacol, que con anterioridad habían sido detectados con FM inferiores a 50%. Entre estos odorantes se encuentran cinco que aportan diferencias significativas entre muestras (2-metilbutirato de etilo, 3-metil-2-butenol, metional, guayacol y ácido decanoico). En el caso del 2-metilbutirato de etilo y del 3-metil-2-butenol, las sidras que presentaron los valores menores de frecuencia modificada (SH3 y SH1 respectivamente) alcanzaron concentraciones mínimas también en el análisis cuantitativo (Tabla 7.3.2).

En el segundo grupo de odorantes (FM < 50), han sido detectados ocho picos que no habían sido observados en las sidras estudiadas hasta el momento, mayoritariamente descritos como dulzones (marcados en negrita en la Tabla 7.3.3). Entre los odorantes de esta segunda categoría, cabe destacar el acetato de isoamilo y el *l*-3-hexenol, que aportan diferencias muy significativas entre muestras y se detectan con las frecuencias más elevadas en SH3 y SH1 respectivamente en concordancia con el análisis cuantitativo (Tabla 7.3.2). Así mismo, el butirato de etilo también aporta diferencias significativas entre las muestras estudiadas, alcanzando frecuencias más elevadas en las referencias SH2 y SH3.

**Tabla 7.3.3.** Perfiles olfatométricos de las sidras analizadas: descripción olfativa, identificación, frecuencias modificadas, frecuencia modificada promedio y resultados de significación.

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	Significación	SH1	SH2	SH3	FM Promedio
<i>FM promedio ≥ 50%</i>								
972		Mantequilla	Diacetilo	ns	56	61	38	52
1074	805	Frutal, dulce, manzana	2-Metilbutirato de etilo	**	63	73	49	62
1217	750	Tipo alcoholes superiores	Alcoholes amílicos	ns	66	71	67	68
1299	805	Ahumado, tostado	3-Metil-2-butenol	*	37	72	70	59
1448		Vinagre, alcoholes superiores	Ácido acético	ns	76	68	75	73
1466	908	Polvo, rancio, vegetales cocidos	Metional	***	75	15	74	55
1508		Graso, frutal	ni	ns	66	71	76	71
1635	954	Rancio, barniz	γ-Butirolactona	ns	66	79	77	74
1681		Queso, rancio	Ácido 2-metilbutanoico	ns	77	65	80	74
1735	1013	Vegetales cocidos, azufrado	Metionol	ns	70	57	37	54
1837	1267	Compota, floral	Acetato de 2-feniletilo	ns	75	66	74	72
1860	1174	Graso, establo	Ácido hexanoico	ns	40	68	73	60
1880	1118	Ahumado, dulce, especiado	Guayacol	**	42	71	63	59
1929	1175	Rosas	2-Feniletanol	ns	80	73	75	76
2047	1294	Dulce, especiado	4-Etilguayacol	ns	81	82	71	78
2078	1358	Graso, establo, especiado	Ácido octanoico	ns	55	68	63	62
2194	1165	Cuero, establo	4-Etilfenol	ns	53	38	68	53
2210	1095	Ahumado, especiado, curry	Sotolón	ns	88	70	87	81
2285	1451	Graso, establo	Ácido decanoico	*	42	75	75	64
<i>FM promedio &lt; 50%</i>								
<b>994</b>		<b>Caramelo, dulce</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>43</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>24</b>
<b>1016</b>		<b>Dulce, frutal</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>33</b>	<b>51</b>	<b>7</b>	<b>30</b>
1057	804	Frutal	Butirato de etilo	***	9	58	42	36
1093	818	Fruta madura	Acetato de butilo	*	57	26	58	47
<b>1098</b>		<b>Frutal</b>	<b>ni</b>	<b>**</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>37</b>	<b>17</b>
1144	879	Plátano, frutal	Acetato de isoamilo	***	7	9	50	22

Tabla 7.3.3. (Cont.)

IRL <sub>WAX</sub>	IRL <sub>5</sub>	Descripción	Identidad Química	Significación	SH1	SH2	SH3	FM Promedio
1240	1183	Fruta madura	Hexanoato de etilo	ns	46	32	27	35
1294	983	Setas	1-Octen-3-ona	**	55	32	33	40
1364	889	Floral, frutal	Hexanol	ns	45	35	42	41
1383	887	Floral, geranio	<i>t</i> -3-Hexenol	***	72	54	7	44
1404	867	Floral, dulce	<i>c</i> -3-Hexenol	ns	50	35	33	39
<b>1435</b>		<b>Comida, ketchup, rancio</b>	<b>ni</b>	<b>*</b>	<b>38</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>25</b>
1494	957	Frutal, floral	3-Hidroxi-butirato de etilo	ns	41	26	34	34
1519	856	Graso, establo	Ácido propanoico	ns	33	11	41	28
1567	966	Lácteo, queso azul	Ácido butanoico	ns	37	37	39	37
<b>1591</b>		<b>Dulce, caramelo</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>22</b>	<b>42</b>	<b>47</b>	<b>37</b>
1736		Graso	Ácido pentanoico	ns	33	63	41	46
1768		Caldoso	ni	**	55	15	19	29
1801		Dulce, floral	4-Hidroxi-butirato de etilo <sup>a</sup>	**	58	18	13	30
1903	1071	Floral, frutal, dulce	Alcohol bencílico	ns	24	35	7	22
<b>1954</b>		<b>Sudado, graso</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>37</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>29</b>
<b>1966</b>		<b>Especiado dulce, floral</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>53</b>	<b>41</b>	<b>43</b>	<b>46</b>
1986		Floral, especiado	ni	ns	34	20	11	21
2001	1088	Ahumado	<i>o</i> -cresol	ns	32	7	11	17
2109	1099	Cuero, establo	<i>m</i> -cresol	*	47	32	68	49
2171	1476	Especiado, dulce, establo	$\gamma$ -Decalactona	ns	32	29	41	34
2183	1385	Especiado, clavo	Eugenol	ns	57	42	57	52
<b>2215</b>		<b>Queso, dulzón</b>	<b>ni</b>	<b>ns</b>	<b>29</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>24</b>
2246	1279	Ahumado, especiado	4-Vinilguayacol	ns	32	35	66	44
2261	1913	Resinoso, hierba seca	Hexadecanoato de etilo	ns	67	32	34	44

IRL<sub>WAX</sub>, IRL<sub>5</sub>: índice de retención lineal en las columnas DB-WAX y DB-5; ni: no identificado; ns: no significativo; (\*): significativo al 10%; (\*\*): significativo al 5%; (\*\*\*): significativo al 1%; a: tentativamente identificado.

**Discusión  
general**

**8.1. Composición cuantitativa**

**8.2. Perfiles olfatométricos**



## 8.1. Composición cuantitativa

En esta memoria se ha llevado a cabo el análisis del aroma de los diferentes tipos de sidra presentes en el mercado (tradicional, nueva expresión, espumosa y de hielo), evaluándose mediante análisis cuantitativo y olfatométrico el efecto sobre su perfil aromático del origen y la maduración de la bebida, las condiciones de conservación en botella, y la crianza sobre borras.

Entre los **compuestos volátiles mayoritarios** destacaron los alcoholes amílicos, el acetato de etilo y el lactato de etilo, junto con otros alcoholes superiores como el *i*-butanol y el 1-propanol. Todos estos componentes son productos típicos de la fermentación y, por lo tanto, su presencia y contenidos son similares a los de otras bebidas fermentadas (Pires *et al.*, 2014; Swiegers *et al.*, 2005).

El origen de las sidras tuvo una influencia significativa en el contenido de acetato de etilo, 2-butanol, *i*-butanol, alcohol alílico, 1-butanol, amílicos y 2-feniletanol (Tabla 4.2.2). Estas diferencias pueden atribuirse a diferentes factores tecnológicos: las variedades de manzana utilizadas, las cepas de levaduras y bacterias lácticas predominantes en cada zona, los sistemas de prensado, o la turbidez de los mostos durante la fermentación (Cabranes *et al.*, 1997; Dueñas *et al.*, 1994; González Calvo, 2004; Haider *et al.*, 2014; Mangas *et al.*, 1993; Pando Bedriñana *et al.*, 2010; Pollard *et al.*, 1966; Satora *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2007a; Vidrih y Hribar, 1999).

La maduración de la sidra tradicional puede llevarse a cabo sobre las *borras* o en ausencia de éstas, efectuando un primer trasiego al final de la fermentación. Posteriormente, y hasta el momento de comercialización, se puede optar por mezclar diferentes sidras con el fin de obtener una mayor homogeneidad en la bodega.

Las concentraciones de los compuestos volátiles mayoritarios, excepto del 1-butanol, *i*-butanol y acetoína, son significativamente superiores en las sidras maduras (Tabla 4.2.2). Los microorganismos involucrados en la fermentación y la mayor presencia de alcoholes permitirían explicar la



producción de ésteres. La transformación maloláctica contribuiría también de modo significativo al aumento del contenido de lactato de etilo (Beech y Carr, 1977).

El estudio de la crianza sobre *borras* puso de manifiesto una influencia negativa del contacto con lías sobre los contenidos de *i*-butanol, alcoholes amílicos y acetoína, y el aumento de la concentración de 1-propanol (Tabla 5.3.1). La aplicación de microoxigenación no tuvo influencia alguna sobre la composición aromática, mientras que la adición de  $\beta$ -glucanasa dio lugar a una disminución significativa de casi todos los compuestos analizados (Tabla 5.3.2). Trabajos previos realizados en vinos han puesto de manifiesto la dificultad de interpretar el efecto sobre el aroma de un breve contacto con borras o del tratamiento con oxígeno y/o enzima (Bautista *et al.*, 2007; Bueno *et al.*, 2006; Masino *et al.*, 2008; Hernández-Orte *et al.*, 2009; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2010). La variabilidad de los resultados obtenidos se explica sobre la base de la influencia de otros factores, como la variedad de uva (Bueno *et al.*, 2006; Hernández-Orte *et al.*, 2009; Ortega-Heras *et al.*, 2008), la naturaleza y características de las lías y el tiempo de contacto con éstas (Bautista *et al.*, 2007; Gallardo-Chacón *et al.*, 2010).

Con respecto a la **fracción aromática minoritaria** de la sidra, las familias predominantes son ácidos grasos, alcoholes y fenoles volátiles, que han sido descritos en diversos estudios cualitativos previos (Williams, 1974; Williams y May, 1981; Williams y Tucknott, 1971; 1978; Williams *et al.*, 1978).

Los ácidos grasos representaron entre el 25 y el 40% de esta fracción aromática. El ácido octanoico fue el mayoritario, seguido del hexanoico y el decanoico. Este perfil fue coincidente con el descrito en vinos tranquilos y cavas (Garde-Cerdán *et al.*, 2008; Genovese *et al.*, 2007; Perestrelo *et al.*, 2006; Pérez-Coello *et al.*, 2003; Sánchez Palomo *et al.*, 2007; Torrens *et al.*, 2010), aunque discrepa ligeramente de lo observado en otros estudios realizados en sidras en los que, o bien no se encuentran diferencias en los contenidos de estos ácidos (Margolles Cabrales *et al.*, 2003), o bien el ácido decanoico es el mayoritario (Blanco Gomis *et al.*, 2001). En las sidras de hielo

analizadas, el ácido hexanoico fue el principal componente de esta familia, de acuerdo con lo descrito en vinos de hielo (Cliff *et al.*, 2002).

Los contenidos medios de ácidos grasos fueron similares a los descritos con anterioridad en sidras naturales (Blanco Gomis *et al.*, 2001; Mangas *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004). Esta concentración podría atribuirse, entre otros factores, a las diferentes mezclas de manzana, cuyos perfiles varían en función de las variedades y cosechas (Blanco Gomis *et al.*, 2002), y a las condiciones de fermentación, habiéndose descrito en vinos una clara influencia de las cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* (Antonelli *et al.*, 1999; Tufariello *et al.*, 2014). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en las concentraciones de estos componentes en función del origen de esta bebida.

El contacto con las *borras* de fermentación afectó a las concentraciones de los ácidos hexanoico y octanoico que experimentaron un incremento significativo (Tabla 5.3.1), en concordancia con lo observado en vinos (Bautista *et al.*, 2007; Bueno *et al.*, 2006), potenciado por la acción del oxígeno (Tabla 5.3.2). Este comportamiento fue también coherente con el descrito en vinos tintos por Cejudo-Bastante *et al.* (2011a; 2012) y Ortega-Heras *et al.* (2008), y depende del estado de la fermentación en el momento de la aplicación del tratamiento de microoxigenación y de la variedad de uva (Cejudo-Bastante *et al.*, 2011a, b; Hernández-Orte *et al.*, 2009). Por su parte, la adición de  $\beta$ -glucanasa dio lugar a un descenso de la concentración de todos los ácidos grasos, significativo en el caso del ácido decanoico (Tabla 5.3.2).

Los ácidos grasos están involucrados en la síntesis de ésteres y, dependiendo del equilibrio ácido-éster, pueden esperarse distintas tendencias de variación (Sumby *et al.*, 2010). Así, la disminución de la concentración de ácido octanoico asociada al tratamiento con  $\beta$ -glucanasa podría explicar el incremento en el contenido en octanoato de etilo.

Durante la conservación en botella de las sidras de nueva expresión, se observó el incremento de las concentraciones de todos los ácidos grasos a los seis meses, para disminuir posteriormente, si exceptuamos el ácido decanoico

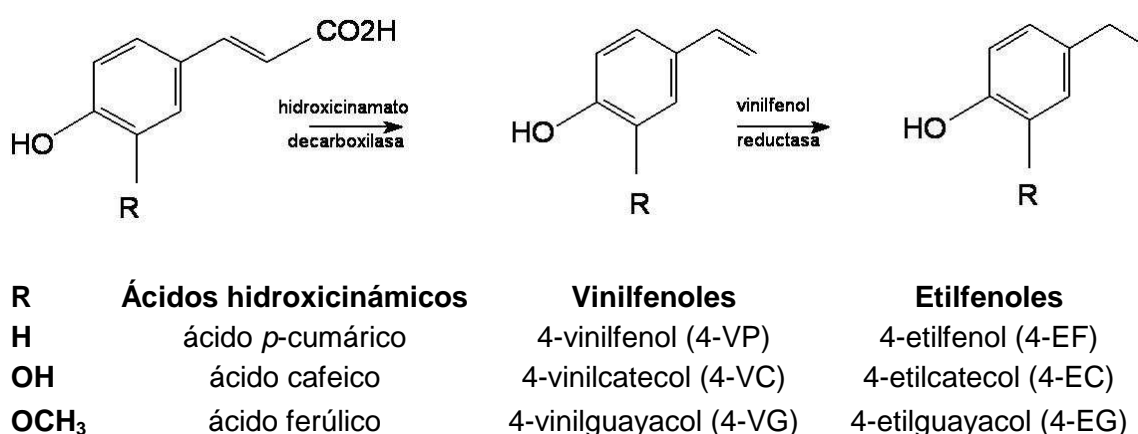
que mostró un aumento neto al final del periodo estudiado. Tendencias similares han sido descritas en vinos blancos fermentados sin sulfuroso (Garde-Cerdán *et al.*, 2008), vinos de la variedad Sauvignon Blanc (Makhotina *et al.*, 2012), o incluso en vinos obtenidos a partir de mostos sometidos a hiperoxidación (Cejudo-Bastante *et al.*, 2011c).

Los fenoles volátiles contribuyeron a la fracción aromática minoritaria con porcentajes comprendidos entre 14-33%, hecho que podría considerarse característico de la sidra. Estos compuestos han sido tradicionalmente asociados al carácter especiado o fenólico, típico de esta bebida (Williams y Tucknott, 1978). A pesar de estar considerados como responsables de olores descritos como cuero o establo (Chatonnet *et al.*, 1993), ninguna de las sidras estudiadas presentó este defecto, por lo que esta asociación debería revisarse (Buron *et al.*, 2011a; Romano *et al.*, 2009). Las concentraciones encontradas en todas las muestras estudiadas fueron superiores a las descritas en otras bebidas, como vinos (Castro-Mejías *et al.*, 2003; Díez *et al.*, 2004; López *et al.*, 2002), o cervezas (Vanbeveden *et al.*, 2006; 2008a), y comparables a las observadas en sidras francesas (Buron *et al.*, 2011a). De manera general, el fenol volátil más abundante fue el 4-EC, y el 4-EG fue el minoritario.

La concentración de los fenoles volátiles está relacionada con el metabolismo de los lactobacilos, en particular, de algunas cepas de *Lactobacillus paracollinoides*, las cuales son capaces de sintetizar grandes cantidades de estos compuestos a partir de los ácidos hidroxicinámicos (Beech y Carr, 1977; Buron *et al.*, 2011b), de acuerdo con el esquema de la Figura 8.1.1.

En las sidras naturales asturianas, los ácidos *p*-cumárico y cafeico están presentes a nivel residual, destacando en estos perfiles la presencia de ácido hidrocafeico resultante de la reducción del ácido cafeico (Rodríguez *et al.*, 2006). Por su parte, el ácido ferúlico se encuentra en las sidras españolas en niveles muy bajos (Alonso-Salces *et al.*, 2004b), lo que explicaría las menores concentraciones de 4-EG con respecto a los demás fenoles volátiles. Además, estudios realizados en vino muestran que las levaduras *Saccharomyces* son

capaces de transformar por descarboxilación no oxidativa el ácido ferúlico en el vinilfenol correspondiente (4-VG). Esta actividad se expresa durante la fermentación alcohólica con una intensidad variable en función de la cepa (Chatonet *et al.*, 1993), lo que podría explicar, en parte, las diferencias encontradas en la concentración de este fenol volátil sobre la base del origen de las sidras.



**Figura 8.1.1.** Principales ácidos hidroxicinámicos y sus derivados volátiles.

El grado de maduración afectó significativamente a las concentraciones de 4-VG y 4-EC tanto en las sidras asturianas como en las vascas. El primer compuesto disminuyó, e incluso desapareció en las sidras vascas, mientras que el segundo aumentó su contenido. Este mismo comportamiento fue observado al comparar las sidras trasegadas, utilizadas como control, con las sidras en contacto con *borras* (Tabla 5.3.1). Estudios previos realizados sobre el efecto de la crianza sobre *borras* en la concentración de fenoles volátiles en vino describen distintos patrones de variación. Por un lado, se ha puesto de manifiesto la influencia de la cepa de levadura en la disminución de estos compuestos debido a su adsorción por parte de las *borras* (Chassagne *et al.*, 2005; Pradelles *et al.*, 2008) y, por otro, se han observado incrementos significativos de fenoles volátiles como consecuencia del contacto con lías (Masino *et al.*, 2008). En nuestro caso, el aumento en los contenidos de 4-EF y 4-EC en las sidras en contacto con *borras* puede estar relacionado además con

el metabolismo de bacterias lácticas. Cabe destacar el hecho de que las sidras de hielo resultaron menos fenólicas que las sidras naturales.

La conservación en botella de las sidras originó también incrementos en las concentraciones de estos fenoles volátiles, de acuerdo con lo descrito en cervezas (Vanbeneden *et al.*, 2008b), pero contrario a lo observado en vinos Chardonnay (Cejudo-Bastante *et al.*, 2011c).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede considerar el 4-EC como un marcador apropiado para definir el estado de madurez de la sidra natural.

Los alcoholes minoritarios contribuyen a la fracción volátil con porcentajes comprendidos entre el 17 y el 28%. Entre estos alcoholes el hexanol fue el más importante, con contenidos similares a los encontrados en otras sidras extranjeras (Wang *et al.*, 2004; Satora *et al.*, 2009). Los isómeros geométricos del 3-hexenol han sido previamente descritos en extractos de manzana y sidra (Mehinagic *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Estos alcoholes, que aportan notas olfativas herbáceas más o menos intensas según su concentración, provienen de los productos de oxidación de lípidos formados durante la etapa pre-fermentativa, lo que podría explicar las diferencias cuantitativas observadas en función del origen (Tabla 4.2.2). La maduración y la crianza sobre *borras* de las sidras dieron lugar al incremento en el contenido todos estos alcoholes de seis átomos de carbono (Tablas 4.2.2. y 5.3.1).

En relación con el tiempo de permanencia en botella, hay que resaltar que el 3-metil-1-pentanol y el *t*-3-hexenol permanecieron constantes a lo largo del periodo de conservación (Tabla 6.3.1). En general, se detectó que los alcoholes alcanzaron un máximo de concentración a los seis meses del embotellado, en concordancia con lo descrito en vinos almacenados a temperatura ambiente (Garde-Cerdán *et al.*, 2008). Este comportamiento podría explicarse por la posible transformación de aminoácidos residuales en los correspondientes alcoholes una vez completada la fermentación alcohólica (Garde-Cerdán *et al.*, 2007). El *c*-3-hexenol tuvo un comportamiento diferente, ya que disminuyó a lo largo del periodo de almacenamiento. Este alcohol, junto

con hexanol y *t*-3-hexenol, provienen de la degradación oxidativa de los ácidos grasos y no están relacionados con el metabolismo de los aminoácidos.

Los ésteres de etilo y acetatos, familias minoritarias en todas las sidras, representaron entre el 5 y el 14% de esta fracción aromática. Estos compuestos suelen estar asociados con el aroma frutal de las bebidas fermentadas, estando su formación muy influenciada por las condiciones de elaboración. El propionato y el 4-hidroxibutirato de etilo alcanzaron las concentraciones más altas, mientras que el acetato de isoamilo fue el mayoritario entre los acetatos analizados.

Los datos obtenidos para las sidras tradicionales fueron ligeramente inferiores a los observados en estudios previos de sidras asturianas (Mangas *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2005). El origen de la sidra afectó de modo significativo a los contenidos de 4-hidroxibutirato de etilo, de octanoato de etilo y de los acetatos, excepto el de butilo, encontrándose niveles superiores en las sidras asturianas con respecto a las vascas. El acetato de isoamilo, caracterizado por su aroma a plátano, se forma por esterificación entre el ácido acético y el alcohol isoamílico. Su contenido en sidra está influenciado tanto por el prensado (González Calvo, 2004) como por el tipo de levadura que conduce la fermentación alcohólica (Lilly *et al.*, 2000), lo que podría explicar las diferencias observadas en las concentraciones entre sidras asturianas y vascas. Por otra parte, la producción de acetato de isoamilo se encuentra íntimamente ligada a la actividad de las levaduras no-*Saccharomyces*, según estudios realizados en zumos de manzana fermentados (Pietrowski *et al.*, 2012) y en vinos (Rojas *et al.*, 2001). La influencia de estas levaduras sobre los contenidos de acetato de 2-feniletilo y octanoato de etilo ha sido puesta de relieve en el aguardiente de magaya (Rodríguez Madrera *et al.*, 2013), y en vinos (Antonelli *et al.*, 1999; Tufariello *et al.*, 2014).

La maduración aumentó significativamente la concentración de propionato, butirato y hexanoato de etilo (Tabla 4.2.2), hecho que podría estar relacionado con la capacidad de las bacterias lácticas de sintetizar ésteres de etilo y otros compuestos volátiles como ácidos grasos, alcoholes y  $\gamma$ -

butirolactona (Sumbly *et al.*, 2010; Ugliano *et al.*, 2005). Cuando la maduración tuvo lugar sobre *borras* se incrementaron los contenidos de los ésteres de etilo, con excepción del 3- y el 4-hidroxibutirato de etilo, y de los ésteres de acetato (Tabla 5.3.1). Por el contrario, la microoxigenación no afectó al contenido de ésteres, en concordancia con lo descrito en vinos tintos de la variedad Cencibel (Cejudo-Bastante *et al.*, 2012), mientras que la adición de enzima aumentó el contenido de octanoato de etilo (Tabla 5.3.2).

El tiempo de conservación en botella provocó una disminución del contenido de ésteres, con excepción del propionato de etilo que aumentó su concentración con el tiempo, y el 3-hidroxibutirato de etilo, que no experimentó variación alguna en el periodo estudiado. El 2-metilbutirato de etilo y el acetato de 2-feniletilo manifestaron, también, un comportamiento ligeramente diferente, ya que aumentaron su concentración tras seis meses en botella, disminuyendo al final del año. Estos resultados son similares a los observados en vino (Pérez-Prieto *et al.*, 2003; Pérez-Coello *et al.*, 2003; Roussis *et al.*, 2005; Lambropoulos *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 1997) y en cerveza (Vanderhaegen *et al.*, 2003), y podrían ser explicados en función de los diferentes equilibrios de hidrólisis-esterificación de los ésteres (Ramey *et al.*, 1980; Ferreira *et al.*, 1995; Sumbly *et al.*, 2012). Este hecho es relevante, ya que los ésteres de etilo y los acetatos se asocian con el carácter frutal de las bebidas. Cabe destacar la elevada concentración de 4-hidroxibutirato de etilo en las sidras de hielo (Tabla 7.3.2).

Otros compuestos analizados fueron el 3-etoxi-1-propanol, la  $\gamma$ -butirolactona y el metionol.

El 3-etoxi-1-propanol se detectó en concentraciones superiores en sidras asturianas (Tabla 4.2.2). Su producción es altamente dependiente de la cepa de levadura, ya que se trata de un metabolito sintetizado por levaduras *Saccharomyces* a partir de la homoserina e inhibido por un exceso de metionina (Irwin, 1992). La baja concentración de homoserina en manzanas y sidras (Blanco Gomis *et al.*, 1992) sugiere que esta ruta no sea importante en

la síntesis de este compuesto. La reacción de la acroleína con el etanol puede justificar la formación del 3-etoxi-1-propanol por otra vía.

El grado de madurez, la crianza sobre borras y el tratamiento con oxígeno incrementaron la concentración de este compuesto (Tablas 4.2.2, 5.3.1 y 5.3.2). Sin embargo, se detectó una disminución durante el tiempo de almacenamiento, en concordancia con lo observado en vinos blancos jóvenes (Pérez-Coello *et al.*, 2003).

La  $\gamma$ -butirolactona alcanzó concentraciones en torno a 1,5 mg/L. Las lactonas se forman por reacciones de esterificación intra-molecular de los correspondientes hidroxiaácidos en condiciones ácidas o por reacciones enzimáticas. Las sidras vascas tienen valores de pH más ácidos que las asturianas (Tabla 4.2.1), hecho concordante con la mayor concentración de  $\gamma$ -butirolactona en estas sidras. Esta lactona alcanzó un máximo de concentración tras seis meses de permanencia en botella.

El metionol se detectó en todos los tipos de sidra analizados, en concentraciones similares a las descritos en vino (Mestres *et al.*, 2000), cerveza (Hill y Smith, 2000) y en sidras (González Calvo, 2004). Se trata de un sulfuro volátil que se genera a partir de la metionina que aporta olor a coliflor si se supera la concentración umbral.

Las sidras maduras presentaron concentraciones superiores de metionol y  $\gamma$ -butirolactona, hecho que, como ya se ha dicho, podría estar relacionado con la capacidad de las bacterias lácticas de sintetizarlos (Ugliano *et al.*, 2005).

## 8.2. Perfiles olfatométricos

El análisis olfatométrico reveló la importante contribución al aroma de la sidra de los ésteres de etilo, acetatos, fenoles volátiles y ácidos grasos.

Estos perfiles han sido descritos con anterioridad en sidras inglesas (Williams y Tucknott, 1978), destilados de sidra (Guichard *et al.*, 2003), en sidras elaboradas a partir de la variedad Fuji y cultivares chinos (Wang *et al.*,



2004; Xu *et al.*, 2007), así como en sidras dulces francesas (Villière *et al.*, 2012).

Con el objeto de identificar aquellos odorantes más importantes, se consideraron las unidades activas de olor (OAV), definidas como la relación entre la concentración del compuesto volátil ( $\mu\text{g/L}$ ) y su umbral de percepción olfativo ( $\mu\text{g/L}$ ). Para ello, se calculó el valor de las OAV de las sidras en cada grupo de muestras y posteriormente se realizó el promedio. Como se puede observar en la Tabla 8.2.1, 15 de los 35 compuestos cuantificados tuvieron  $\text{OAV} \geq 1$ . Estos volátiles son comúnmente considerados como los principales contribuyentes del aroma (Guth, 1997; Ferreira y Cacho, 2009), aunque su influencia a nivel sensorial está determinada por complejas relaciones de sinergia y antagonismo entre los distintos componentes, así como por las posibles interacciones de éstos con la matriz no volátil de la sidra.

En esta tabla se incluyeron, además, los odorantes cuantificados que no han sido detectados en el análisis olfatométrico, bien debido al método de extracción utilizado, o bien a sus elevados umbrales de detección. Entre estos se encuentran la mayoría de los compuestos volátiles mayoritarios, de los que únicamente el acetaldehído y el acetato de etilo podrían tener una contribución relevante en el aroma de la sidra.

Entre los compuestos con altas OAV se identificaron ésteres de etilo (butirato, 2-metilbutirato, hexanoato y octanoato), acetatos (de etilo y de isoamilo), ácidos grasos (hexanoico, octanoico y decanoico), fenoles volátiles (4-EG, 4-EF y 4-VG),  $\gamma$ -butirolactona, acetaldehído, alcoholes amílicos y 2-feniletanol.

**Tabla 8.2.1.** Valor promedio de las Unidades Activas de Olor (OAV) calculadas para las sidras estudiadas y diferentes tipos de vinos.

Compuesto	Umbral (µg/L)	Sidra de nueva expresión	Sidra asturiana madura	Sidra vasca madura	Sidra asturiana joven	Sidra vasca joven	Sidra espumosa	Sidra de hielo	Vino tinto envejecido <sup>4,5</sup>	Vino tinto joven <sup>6,7,8</sup>	Vino blanco <sup>9,10,11</sup>	Vinos de hielo <sup>12</sup>
<b>Ésteres de etilo y acetatos</b>												
Propionato de etilo	5.000 <sup>1</sup>	< 0,1	0,37	0,28	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1-0,74		
Butirato de etilo	20 <sup>2</sup>	10,7	8,02	7,99	5,78	5,77	9,3	11,28	15,3-25,9	< 0,1-62,50	7,95-8,00	3,93-6,86
2-Metilbutirato de etilo	18 <sup>2</sup>	1,44	2,39	1,69	1,21	1,93	1,43	3,56	1,03-3,40	0,2-1,1	0,62	1,52
Hexanoato de etilo	14 <sup>2</sup>	10,98	12,4	12,66	10,48	10,23	16,12	13,26	18,2-36,00	< 0,1-114,29	17,10-90,00	27,20-34,30
Octanoato de etilo	5 <sup>2</sup>	61,35	42,11	35,48	41,44	31,57	28,24	25,84	32,40-70,10	< 0,1-205,00	1,04-26,00	88,30-148,00
3-Hidroxibutirato de etilo	20.000 <sup>3</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
Acetato de propilo	65.000 <sup>1</sup>	nc	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
Acetato de butilo	1.800 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
Acetato de isoamilo	30 <sup>2</sup>	13,09	14,76	8,1	20,65	6,09	10,49	5,86		83,00	5-16,22	5,77
Acetato de 2-feniletilo	250 <sup>2</sup>	0,48	0,36	0,19	1,13	0,17	0,34	nc	0,05-0,19	< 0,1-0,40	0,57-1,16	0,04
<b>Alcoholes</b>												
3-Metil-1-pentanol	50 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
Hexanol	8.000 <sup>3</sup>	0,52	0,64	0,62	0,47	0,5	0,78	0,86	0,28	< 0,1-1,54	0,21	0,10-0,19
ƒ-3-Hexenol	39 <sup>1</sup>	0,95	0,86	0,7	0,67	0,54	1,3	1,68			0,05	
c-3-Hexenol	400 <sup>2</sup>	0,82	0,55	0,36	0,43	0,25	0,99	0,55	0,51-1,99	< 0,1-1,50	0,07-0,35	
Alcohol bencílico	200.000 <sup>3</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1	
Alcoholes amílicos	30.000 <sup>3</sup>	6,42	6,44	5,98	5,69	4,05	1,08	3,93		1,50	9,86	
2-Feniletanol	10.000 <sup>1</sup>	8,9	9,55	6,21	9,28	4,17	0,73	1,44	1,71-5,94	1,0-6,0	0,55-2,64	

Tabla 8.2.1. (Cont.)

Compuesto	Umbral (µg/L)	Sidra de nueva expresión	Sidra asturiana madura	Sidra vasca madura	Sidra asturiana joven	Sidra vasca joven	Sidra espumosa	Sidra de hielo	Vino tinto envejecido <sup>4,5</sup>	Vino tinto joven <sup>6,7,8</sup>	Vino blanco <sup>9,10,11</sup>	Vinos de hielo <sup>12</sup>
<b>Ácidos grasos</b>												
Ácido hexanoico	420 <sup>2</sup>	7,06	7,9	10,66	6,28	6,46	12,11	7,53	3,43-9,92	0,63-9,2	6,72	
Ácido octanoico	500 <sup>3</sup>	7,26	8,16	10,48	8,69	6,82	10,2	5,15	2,19-6,61	< 0,1-9,9	11,49-43,70	
Ácido decanoico	1.000 <sup>3</sup>	1,08	1,73	1,79	2,3	1,72	0,97	1,02	0,29-0,57	< 0,1-2,71	2,25	
<b>Fenoles volátiles</b>												
4-Etilguayacol	33 <sup>3</sup>	9,64	19,68	16,16	17,64	19,35	25,33	4,84	6,00	<0,1-4,3		
4-Etilfenol	440 <sup>3</sup>	4,24	5,26	5,25	4,48	5,1	6,89	3,53	0,27-11,00	< 0,1-0,30	0,01	
4-Vinilguayacol	40 <sup>3</sup>	11,08	20,85	< 0,1	55,53	28,02	20,02	20,16		< 0,1-31,00	1,35-61,5	
<b>Otros</b>												
γ-Butirolactona	100 <sup>3</sup>	13,17	17,36	26,41	5,12	11,37	25,93	36,98	0,60-1,38	< 0,1-0,46		
Metionol	1.000 <sup>2</sup>	0,74	0,59	0,62	0,45	0,49	0,63	0,55	1,70-3,88	< 0,1-1,20	2,90	
Acetoína	150.000 <sup>2</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,42	0,1	0,03-0,21			
<b>Compuestos no analizados por olfatometría</b>												
Acetaldehído	500 <sup>2</sup>	5,78	9,76	4,82	1,19	0,16	nd	59,73	84,9-97,2			
Acetato de etilo	12.264 <sup>2</sup>	5,28	7,54	5,59	3,79	2,51	1,87	8,08		6,90		
Metanol	668.000 <sup>1</sup>	< 0,1	0,12	< 0,1	< 0,1	< 0,1	2,27	0,3				
2-Butanol	1.000.000 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,86					
1-Propanol	830.000 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,03	< 0,1		< 0,1		
iso-butanol	40.000 <sup>2</sup>	0,85	0,97	0,92	0,93	0,65	1,3	0,63		1,40	2,70	
1-Butanol	820.000 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,69	< 0,1		< 0,1	<0,1	
Lactato de etilo	154.636 <sup>2</sup>	1,29	1,3	1,41	0,73	0,79	0,83	1,17		0,10		
3-Etoxi-1-propanol	50.000 <sup>1</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				

nc: no cuantificado; 1: Moreno *et al.*, 2005; 2: Ferreira *et al.*, 2002b; 3: Escudero *et al.*, 2007; 4: Culleré *et al.*, 2004; 5: Aznar *et al.*, 2001; 6: Escudero *et al.*, 2004; 7: Noguero-Pato *et al.*, 2012; 8: Capone *et al.*, 2013; 9: Losada *et al.*, 2012; 10: González-Álvarez *et al.*, 2011; 11: Pet'ka *et al.*, 2006; 12: Bowen y Reynolds, 2012.

Destaca, en particular, el octanoato de etilo, con OAV comprendidos entre 25,84 y 61,35, seguido del hexanoato de etilo y el acetato de isoamilo en sidras tradicionales asturianas maduras. En el caso del octanoato de etilo, estos valores fueron superiores a los descritos en vinos blancos (Losada *et al.*, 2012; González-Álvarez *et al.*, 2011; Pet'ka *et al.*, 2006) y, exceptuando el descrito en vinos jóvenes de la variedad Garnacha Tintorera (Noguerol-Pato *et al.*, 2012), similares a los encontrados en vinos tintos. Los valores de OAV observados para el hexanoato de etilo resultaron inferiores a los descritos en vinos tintos envejecidos y blancos, pero acordes con el rango descrito en tintos jóvenes (Aznar *et al.*, 2001; Culleré *et al.*, 2004; Escudero *et al.*, 2004; Noguerol-Pato *et al.*, 2012; Capone *et al.*, 2013). En el caso del acetato de isoamilo, los valores calculados en sidras fueron semejantes a los encontrados para vinos blancos (Pet'ka *et al.*, 2006; González-Álvarez *et al.*, 2011; Losada *et al.*, 2012). Estos valores de OAV revelan una importante componente frutal en las sidras, ya que los ésteres están asociados a este atributo. Como ya se ha indicado, su formación está muy influenciada por el sistema de elaboración, lo que explicaría las diferencias observadas entre los diferentes tipos de sidras. Los ácidos grasos contribuyen notablemente a la fracción aromática de la sidra y se describen como queso, graso y notas rancias. Estudios realizados en vinos tintos de Burdeos (Kotseridis y Baumes, 2000) corroboran la importancia de los ácidos grasos en el aroma. En la sidra, los ácidos octanoico y hexanoico presentaron OAV entre 5,15 y 12,11, valores similares a los encontrados en vinos tintos (Culleré *et al.*, 2004; Aznar *et al.*, 2001; Escudero *et al.*, 2004; Noguerol-Pato *et al.*, 2012; Capone *et al.*, 2013), e inferiores a los detectados en vinos blancos en el caso del ácido octanoico (Pet'ka *et al.*, 2006; González-Álvarez *et al.*, 2011; Losada *et al.*, 2012).

Entre los fenoles volátiles destacaron el 4-EG y el 4-VG, especialmente en sidras tradicionales jóvenes. En el caso del 4-EG estos valores fueron superiores a los detectados en vinos; mientras que el 4-EF alcanzó valores máximos de 6,89, inferiores a los descritos en vinos tintos envejecidos (Tabla 8.2.1). El 4-VG se encuentra en rangos similares a los encontrados en vinos tintos jóvenes y blancos (Aznar *et al.*, 2001; Culleré *et al.*, 2004; Escudero *et*

*al.*, 2004; Pet'ka *et al.*, 2006; González-Álvarez *et al.*, 2011; Noguerol-Pato *et al.*, 2012; Losada *et al.*, 2012; Capone *et al.*, 2013). Estos compuestos, junto con el sotolón, contribuyeron a la definición del atributo “especiado” en las sidras naturales estudiadas.

Otros compuestos activos de la sidra fueron la  $\gamma$ -butirolactona, el acetato de etilo, los alcoholes amílicos y el 2-feniletanol. En concreto, la  $\gamma$ -butirolactona y el 2-feniletanol contribuyeron de manera positiva al atributo “frutal”, alcanzando ambos valores de OAV superiores a los encontrados en vinos.

Es particularmente llamativo el caso del acetaldehído, que alcanzó valores superiores de OAV en las sidras de hielo, siendo, en todo caso, inferiores a los detectados en vinos tintos (Culleré *et al.*, 2004; Aznar *et al.*, 2001). La baja concentración de este compuesto en sidra natural está asociada a la ausencia o bajas concentraciones de anhídrido sulfuroso en las etapas de prensado y fermentación (Herrero *et al.*, 2003).

Si se comparan las sidras de hielo con los vinos homólogos, se observa que las primeras alcanzaron valores superiores de las OAV para el butirato de etilo, el 2-metilbutirato de etilo y el hexanol, e inferiores para el hexanoato y el octanoato de etilo (Bowen y Reynolds, 2012).

El análisis olfatométrico puso de manifiesto la existencia de una serie de odorantes presentes en todas las muestras estudiadas. Entre ellos, se encontraron ésteres de etilo y acetatos (2-metilbutirato de etilo, hexanoato de etilo, 3-hidroxi-butirato de etilo y acetato de 2-feniletilo), ácidos (acético, 2-metilbutanoico, hexanoico, octanoico y decanoico), fenoles volátiles (guayacol, 4-EG, y 4-EF), alcoholes (amílicos, *t*-3-hexenol, *c*-3-hexenol y 2-feniletanol), y otros odorantes como metional,  $\gamma$ -butirolactona, metionol,  $\gamma$ -decalactona y sotolón. Ocho de ellos se encuentran presentes, además, con frecuencias modificadas superiores al 50%. Es el caso de los alcoholes amílicos, la  $\gamma$ -butirolactona, el ácido 2-metilbutanoico, el acetato de 2-feniletilo, el ácido hexanoico, el 2-feniletanol, el 4-EF y el sotolón, todos ellos productos típicos de la fermentación. Estos odorantes no aportaron diferencias entre muestras y alcanzaron, de manera general, valores de OAV  $\geq 1$ .

Asimismo, estos compuestos han sido también descritos con elevadas intensidades en sidras elaboradas con variedades de manzana chinas (Xu *et al.*, 2007), y en sidras francesas (Villière *et al.*, 2012), por lo que podrían ser asignados a la estructura básica del aroma de la sidra.

En la situación contraria se encuentran compuestos, en general no identificados, característicos de un único tipo de sidra, y que podríamos considerar componentes diferenciadores. Es el caso de los odorantes con IRL 994,1016, 1098, 1435, 1736, 1954, 1966 y 2215, que son descritos en general como dulzones, y que están presentes únicamente en las sidras de hielo (Tabla 7.3.3). Los odorantes no identificados 1486 y 2219 se localizaron solo en algunas sidras naturales de nueva expresión (Tabla 6.2.3). Todos estos compuestos alcanzan valores bajos de FM, generalmente inferiores al 50%.

El análisis olfatométrico ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para discriminar entre sidras tradicionales en función de su origen y estado de maduración. Algunos odorantes como acetato de propilo, 1-octen-3-ona, ácido 2-metilbutanoico, 2-feniletanol, 4-EG y sotolón permiten diferenciar las sidras en función de su procedencia, mientras que 1-octen-3-ona y 3-metil-2-butenol discriminan las muestras por su estado de maduración, junto con los ácidos propanoico, *i*-butanoico, octanoico y decanoico, eugenol, 4-VG, *m*-cresol, 3-hidroxibutirato de etilo, acetato de 2-feniletilo y metionol.

Se ha demostrado que la utilización de los perfiles olfatométricos es un criterio eficaz para diferenciar sidras en función de su grado de maduración, superior al tradicionalmente basado en el valor de la acidez volátil.

Los perfiles olfatométricos descritos han permitido construir tres modelos matemáticos para explicar la percepción del frutal, el especiado y la calidad aromática de las sidras de nueva expresión. En estos modelos contribuyeron, especialmente, seis compuestos con OAV > 5 (ácido octanoico, 4-EG, 4-EF, 4-VG,  $\gamma$ -butirolactona y 2-feniletanol), junto con otros nueve odorantes.

La ausencia de ésteres de etilo y acetatos entre los principales contribuyentes del modelo frutal resultó algo sorprendente. Cabe apuntar un posible efecto enmascarante de otros componentes de la sidra que dificulten la

plena percepción de este atributo, aspecto que requiere, obviamente, más investigación. La participación de ácidos grasos en la percepción del carácter frutal ha sido descrita con anterioridad en vino tinto (San Juan et al., 2011)

Los resultados indican, por otra parte, la especial relevancia de los fenoles volátiles en el aroma de la sidra, no solo por sus rangos de concentración, sino también por su positiva contribución al carácter especiado de esta bebida, asociación tradicionalmente descrita (Williams y Tucknott, 1978), que debe confirmarse mediante los correspondientes ensayos de reconstitución y omisión.

## **Conclusiones**

---





Del trabajo expuesto en la presente memoria se extraen las siguientes conclusiones:

1. Se ha realizado, por primera vez, la caracterización cuantitativa y olfatométrica de sidras naturales. Desde el punto de vista cuantitativo, los ácidos grasos son la familia más relevante seguida de fenoles volátiles y alcoholes.
2. El análisis olfatométrico revela la importancia de los ésteres de etilo y acetatos, identificándose una estructura básica común a todos los tipos de sidra, constituida principalmente por ésteres de etilo y acetatos, ácidos y fenoles volátiles, además de alcoholes y otros odorantes como metional,  $\gamma$ -butirolactona, metionol,  $\gamma$ -decalactona y sotolón.
3. De entre estos compuestos, ocho de ellos se encuentran presentes con frecuencias modificadas superiores al 50%. Es el caso de los alcoholes amílicos, la  $\gamma$ -butirolactona, el ácido 2-metilbutanoico, el acetato de 2-feniletilo, el ácido hexanoico, el 2-feniletanol, el 4-EF y el sotolón.
4. Las variables químicas no proporcionaron resultados satisfactorios en la construcción de modelos de predicción según el origen de las sidras.
5. Las variables predictivas más correlacionadas con el origen de las sidras han resultado ser acetato de propilo, 1-octen-3-ona, ácido 2-metilbutanoico, 2-feniletanol, 4-EG y sotolón, y por tanto, estos compuestos pueden ser considerados adecuados marcadores en la diferenciación de las sidras por su procedencia.
6. Las variables más relacionadas con el grado de madurez son 1-octen-3-ona y 3-metil-2-butenol. .
7. Se ha evaluado el efecto que tiene en la composición volátil de las sidras naturales y en los perfiles olfatométricos de la sidra la aplicación de

tratamientos basados en el contacto con *borras* de fermentación. El perfil cuantitativo experimenta numerosos cambios asociados a este factor, siendo los más significativos el incremento de los contenidos de 4-EC y ácido octanoico.

8. La sidra natural de nueva expresión se mantiene estable en botella al menos durante seis meses. Transcurridos este tiempo se observan cambios significativos en la concentración de la mayoría de los compuestos analizados, en particular, la disminución de ésteres de etilo y acetatos y el aumento de 4-EC y ácido octanoico. A nivel olfatométrico, los resultados revelan que el tiempo de embotellado influye de manera muy significativa sobre la intensidad de percepción de ésteres, alcoholes, fenoles volátiles y otros compuestos como el sotolón, aumentando de manera general, su intensidad. Transcurrido un año, las intensidades de percepción sensorial de todos los atributos alcanzan su mínimo.
9. Se ha evaluado la influencia de la composición aromática en las percepciones sensoriales en sidra de nueva expresión. En la predicción del frutal participan de forma positiva guayacol, eugenol, ácido *i*-butanoico, 2-feniletanol, metional,  $\gamma$ -butirolactona y hexadecanoato de etilo. El ácido propanoico y el 4-VG son los únicos odorantes observados con una contribución negativa a este atributo. Al atributo especiado contribuyen fundamentalmente los fenoles volátiles y el sotolón.
10. Se ha descrito el perfil aromático de seis sidras con segunda fermentación, el cual parece menos complejo que el de las sidras naturales. Se identificaron compuestos olfatométricos capaces de discriminar entre muestras como ácido acético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido decanoico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, 3-hidroxi-butirato de etilo, *cis*-3-hexenol, metional,  $\gamma$ -decalactona y 4-VG.

11. Se ha llevado a cabo un estudio preliminar sobre el perfil aromático de tres sidras de hielo. Los alcoholes son la familia mayoritaria, seguidos de ácidos grasos y fenoles volátiles, hecho que difiere de los perfiles encontrados en otros tipos de sidras. En cuanto al perfil olfatométrico, han sido detectados ocho picos no identificados y descritos como dulzones, que no habían sido observados en otros tipos de sidras.



## **Bibliografía**

---



**A**cree, T.E. (1997). Peer Reviewed: GC/Olfactometry GC With a Sense of Smell. *Analytical Chemistry*, 69, 170A-175A

AENOR, 1997. Recopilación de normas UNE, Análisis sensorial, Vol. 1 Alimentación. Madrid: AENOR.

Alonso-Salces, R.M., Guyot, S., Herrero, C., Berrueta, L.A., Drilleau, J.M., Gallo, B., Vicente, F. (2004). Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 379, 464-475.

Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1139-1144.

Arias Abrodo, P., Margolles Cabrales, I., Mangas Alonso, J.J., Blanco-Gomís, D. (2005). Fatty acid composition of cider obtained either by traditional or controlled fermentation. *Food Chemistry*, 92, 183-187.

Arriagada-Carrazana, J.P., Sáez-Navarrete, C., Bordeu, E. (2005). Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. *Journal of Food Engineering*, 68, 363-368.

Aznar, M., López, R., Cacho, J.F., Ferreira, V. (2001). Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2924-2929.

**B**altussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11, 737-747.

Bautista, R., Fernández, E., Falqué, E. (2007). Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *European Food Research and Technology*, 224, 405-413.

Beech, F.W., Carr, J.G. (1977). Cider and Perry. En: *Economic Microbiology*, Vol. 1, Alcoholic Beverages; Ed: Rose, A.H., Academic Press, London.

Bénassi, J.L. (2010). Cider in Europe: Local heritage in today's market. Serie de Conferencias Cider and Fruit Wine: local but global, AICV, Bruselas.

Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J.J., Margolles-Cabrales, I., Arias-Abrodo, P. (2001). Gas chromatographic analysis of total fatty acids in cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1260-1263.

Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J., Margolles Cabrales, I., Arias Abrodo, P. (2002). Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1097-1100.



Blanco Gomis, D., Morán Guitérrez, M.J., Gutiérrez Alvarez, M.D., Mangas Alonso, J.J. (1988). Application of HPLC to characterization and control of individual acids in apple extracts and ciders. *Chromatographia*, 25, 1054-1058.

Blanco Gomis, D., Picinelli Lobo, A., Mangas Alonso, J., Gutiérrez Álvarez, M.D. (1992). Determination of amino acids in ripening apples by high performance liquid chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Food Research and Technology*, 194, 134-138.

Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Guadayol, J.M., Caixach, J., López-Tamanes, E., Buxaderas, S. (2007). Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*, 105, 428-435.

Bowen, A.J., Reynolds, A.G. (2012). Odor potency of aroma compounds in riesling and vidal blanc table wines and icewines by gas-chromatography-olfactometry-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2874-2883.

Boylston, T.D., Wang, H., Reitmeier, C.A., Glatz, B.A. (2003). Effects of processing treatment and sorbate addition on the flavor characteristics of apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1924-1931.

Braga, C.M., Ferreira Zielinski, A.A., Marques da Silva, K., Fernandes de Souza, F., Moura Pietrowski, G.A., Couto, M., Granato, D., Wosiacki, G., Nogueira, A. (2013). Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. *Food Chemistry*, 141, 967-974.

Bueno, J.E., Peinado, R.A., Medina, M., Moreno, J. (2006). Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnology Letters*, 28, 1007-1011.

Buron, N., Guichard, H., Coton, E., Ledauphin, J., Barillier, D. (2011a). Evidence of 4-ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders. *Food Chemistry*, 125, 542-548.

Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Lédauphin, J., Guichard, H., Barillier, D., Coton, E. (2011b). Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production activity. *Food Microbiology*, 28, 1243-1251

**C**abranes, C., Blanco, D., Mangas, J.J. (1998). Characterisation of fermented apple products using data obtained from GC analysis. *Analyst*, 123, 2175-2179.

Cabranes, C., Mangas, J.J., Blanco, D. (1997). Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from Spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 165-169.

Cabranes, C., Moreno, J., Mangas, J.J. (1990) Dynamics of yeast populations during cider fermentation in the Asturian region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3881-3884.

Callejón, R.M., Morales, M.L., Silva Ferreira, A.C., Troncoso, A.M. (2008). Defining the typical aroma of sherry vinegar: sensory and chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8086-8095.

Campo, E., Cacho, J., Ferreira, V. (2008). The chemical characterization of the aroma to dessert and sparkling white wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes and Cava) by gas-chromatography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2477-2484.

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfatometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5682-5690.

Capone, S., Tufariello, M., Siciliano, P. (2013). Analytical characterisation of *Negroamaro* red wines by "aroma wheels". *Food Chemistry*, 141, 2906-2915.

Carlucci, A., Monteleone, E. (2001). Statistical validation of sensory data: a study on wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 751-758.

Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., García-Moreno, M.V., García-Barroso, C. (2003). Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 995, 11-20.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M.S. (2011a). Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: effects on color-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines. *Food Chemistry*, 124, 727-737.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M.S. (2011b). Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: effects on color-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines. *Food Chemistry*, 124, 738-748.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M.S. (2011c). Hyperoxygenation and bottle storage of Chardonnay white wines: Effects on color-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4171-4182.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M.S. (2012). Improvement of Cencibel red wines by oxygen addition after malolactic fermentation: study on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5962-5973.

Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., Voilley, A. (2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, 91, 39-44.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 191-202.

Cliff, M., Yuksel, D., Girard, B., King, M. (2002). Characterization of Canadian ice wines by sensory and compositional analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 46-53.

Coelho, E., Coimbra, M.A., Nogueira, J.M.F., Rocha, S.M. (2009). Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption. *Analytica Chimica Acta*, 635, 214-221.

Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Gas Chromatography-Olfactometry and chemical Quantitative Study of the aroma of six Premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653-1660.

**D**el Campo, G., Berregi, I., Santos, J.I., Dueñas, M., Irastorza, A. (2008). Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic musts. *Bioresource Technology*, 99, 2857-2863.

del Campo, G., Santos, J.I., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A. (2003). Cider produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 342-348.

Díez, J., Domínguez, C., Guillén, D.A., Veas, R., Barroso, C.G. (2004). Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1025, 263-267.

Dourtoglou, V., Antonopoulos, A., Dourtoglou, T., Lalas, S. (2014). Discrimination of varietal wines according to their volatiles. *Food Chemistry*, 159, 181-187.

Dravnieks, A. Atlas of Odor Character Profiles; ASTM Data Series DS 61, Philadelphia, PA, 1985.

Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, C., Bilbao, A., Huerta, A. (1994). Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*, 59, 1060-1064.

**E**rasmus, D.J., Cliff, M., van Vuuren, H.J.J. (2004). Impacto of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of ice wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 371-378.

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, F., Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of

odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501-4510.

Escudero, A., Charpentier, M., Etievant, P. (2000). Characterization of aged champagne wine aroma by GC-O and descriptive profile analyses. *Sciences des Aliments*, 20, 331-346.

Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M.A., Ortín, N., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3516-3524.

Etaio, I., Albisú, M., Ojeda, M., Gil, P.F., Salmerón, J., Pérez Elortondo, F.J. (2010a). Sensory quality control for food certification: A case study on wine. Method development. *Food Control*, 21, 533-541.

Etaio, I., Albisú, M., Ojeda, M., Gil, P.F., Salmerón, J., Pérez Elortondo, F.J. (2010b). Sensory quality control for food certification: A case study on wine. Panel training and qualification, method validation and monitoring. *Food Control*, 21, 542-548.

Etaio, I., Gil, P.F., Ojeda, M., Salmerón, J., Pérez-Elortondo, F.J. (2012). Improvement of sensory quality control in PDO products: An example with Txacoli white wine from Bizkaia. *Food Quality and Preference* 23, 138-147.

Evans, D.J., Schmedding, D.J.M., Bruijnje, A., Heideman, T., King, B., Groesbeek, N.M. (1999). Flavour impact of aged beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 301-307.

**F**an, W., Xu, Y., Han, Y. (2011). Quantification of volatile compounds in Chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Journal of the Institute of Breweing*, 117, 61-66.

Ferreira, V., Cacho, J. (2009). Identification of impact odorants of wines. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 393-415.

Ferreira, V., Escudero, A., Fernández, P., Cacho, J.F. (1997). Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *European Food Research & Technology*, 205, 392-396.

Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., Cacho, J.F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 381-392.

Ferreira, V., López, R., Aznar, M. (2002a). Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wine. *Analysis of Taste and Aroma*, 21, 89-112.

Ferreira, V., Pet'ka, J., Aznar, M. (2002b). Aroma extract dilution analysis. Precision and optimal experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1508-1514.

Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Saenz-Navajas, M.P., Cacho, J. (2009). Modeling quality of premium Spanish red wines from Gas-Chromatography-Olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7490-7498

Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., Salmon, J.M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 36, 49-69.

Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 158-162.

**G**allardo-Chacón, J.J., Vichi, S., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2010). Changes in the sorption of diverse volatiles by *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12426-12430.

Gambetta, J.M., Bastian, S.E.P., Cozzolino, D., Jeffery, D.W. (2014). Factors influencing the aroma composition of Chardonnay wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6512-6534.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., Martín-Belloso, O. (2008). Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO<sub>2</sub>. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 469-476.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Martín-Belloso, O., Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of SO<sub>2</sub> on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 103, 771-777.

Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103, 1228-1236.

Gómez-Plaza, E., Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry*, 125, 1131-1140.

González-Alvarez, M., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2011). Relationship between *Godello* white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS. *Food Chemistry*, 129, 890-898.

González Calvo, M.P. (2004). Influencia de la tecnología de elaboración sobre la composición y el aroma de la sidra natural. Evaluación sensorial. Tesis

Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

González-Viñas, M.A., Perez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. (1998). Sensory analysis of aroma attributes of young Airén White wines during storage in the bottle. *Journal of Food Quality*, 21, 285-297.

González-Viñas, M.A., Perez-Coello, M.S., Salvador, M.D., Cabezudo, M.D. Martin-Alvarez, P.J. (1996). Changes in gas-chromatographic volatiles of Young Airen wines during bottle storage. *Food Chemistry*, 56, 399-403.

Green, J.A., Parr, W.V., Breitmeyer, J., Valentin, D., Sherlock R. (2011). Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine. Influence of source of origin. *Food Research International*, 44, 2788-2797.

Grosch, W. (1993). Detection of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 68-73.

Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of food by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26, 533-545.

Guichard, H.; Lemesle, S.; Ledauphin, J.; Barillier, D.; Picoche, B. (2003). Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados.1. Evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 424-432

Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027-3032.

**H**aider, W., Barillier, D., Hayat, A., Gaillard, J.L., Ledauphin, J. (2014). Rapid quantification and comparison of major volatile compounds of ciders from France (Normandy and Brittany) using microextraction by packed sorbent (MEPS). *Analytical Methods*, 6, 1364-1376.

Hernández-Orte, P., Lapeña, A.C., Escudero, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L., Ferrer, S., Cacho, J., Ferreira, V. (2009). Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wine: Malolactic fermentation and aging in wood. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 391-401.

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A.F., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. (2009). Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of White wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, 113, 530-537.

Hidalgo, P., Pueyo, E., Pozo-Bayón, M.A., Martínez-Rodríguez, A.J., Martín-Alvarez, P., Polo, M.C. (2004). Sensory and Analytical Study of Rosé Sparkling Wines Manufactured by Second Fermentation in the Bottle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6640-6645.

Hill, P.G., Smith, R.M. (2000). Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 872, 203-213.

Hopfer, H., Buffon, P.A., Ebeler, S.E., Heymann, H. (2013). The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.

Hubert, B., Brunerie, P., Le Quére, J.M., Drilleau, J.F. (1990). Les composés volatils du cidre: extraction rapide et dosage. *Sciences des Aliments*, 10, 603-618.

**I**báñez, P., Anavi, L., Lozano, J. (2010). The Latin American cider market: Review and prospects for growth. Serie de Conferencias Cider and Fruit Wine: local but global, AICV, Bruselas.

Informe IDEPA-Principado de Asturias (2009). Plan Estratégico para el período 2009-2012 del Cluster de la Industria Agroalimentaria del Principado de Asturias

Irwin, A.J. (1992). 3-Ethoxy-1-propanol: a strain- and species-dependent yeast metabolite. *Journal of the Institute of Brewing*, 98, 427-431.

**J**ansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., van der Greef, J., Timmerman, M.E. (2005). ASCA: Analysis of multivariate data obtained from an experimental design. *Journal of Chemometrics*, 19, 469-481.

Jiménez Moreno, N., Ancín Azpilicueta, C. (2006). The development of esters in filtered and unfiltered wines that have been aged in oak barrels. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 155-161.

**K**ataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.

Komthong, P., Hayakawa, S., Katoh, T., Igura, N., Shimoda, M. (2006). Determination of potent odorants in apple by headspace gas dilution analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 472-478.

Kontkanen, D., Inglis, D.L., Pickering, G.J., Reynolds, A. (2004). Effect of yeast inoculation rate, acclimatization, and nutrient addition on icewine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 363-370.

Kotseridis, Y., Baumes, R. (2000). Identification of impact odorants in Bourdeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 400-406.

- Lambropoulos, I., Roussis, I.G. (2007). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Research International*, 40, 176-181.
- Langstaff, S.A., Guinard, J.X., Lewis, M.J. (1991). Sensory evaluation of the mouthfeel of beer. *American Society of Brewing Chemists*, 49, 54-59.
- Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2688-2693.
- Lea, A.G.H. (1995). Cidermaking. En: Fermented beverage production; Eds: Lea, A.G.H. & Piggott, J.R., Blackie Academic & Professional, London.
- Lea, A.G.H., Arnold, G.M. (1978). Phenolics of cider. Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 478-483.
- Lea, A.G.H., Timberlake, C. (1974). The phenolics of ciders: Procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 1537-1545.
- Lea, A.G.H., Timberlake, C. (1978). The phenolics of ciders: Effect of processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 484-492.
- Lea, P., Næs, T., Rødbotten, M. (1997). Random or fixed assessors in analysis of variance. En: Analysis of variance for sensory data; Eds: Lea, Næs & Rødbotten. Chichester, U.K., John Wiley & Sons, pp 37-45.
- Ledauphin, J., Guichard, H., Saint-Clair, J.F., Picoche, B., Barilier, D. (2003). Chemical and Sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 433-442.
- Lee, D.H., Kang, B.S., Park, H.J. (2011). Effect of oxygen on volatile and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon during secondary shelf life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11657-11666.
- Le Quéré, J.M., Husson, F., Renard, C., Primault, J. (2006). French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 1033-1044.
- Lermusieau, G., Bulens, M., Collin, S. (2001). Use of GC-Olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3867-3874.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 744-753.



Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, J-L., Glories, Y. (2006). Impact of storage position on oxygen Ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6741-6746.

López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography, A*, 966, 167-177.

Lorrain, B., Ballester, J., Thomas-Danguin, T., Blanquet, J, Meunier, J.M., Le Fur, Y. (2006). Selection of potential impact odorants and sensory validation of their importance in typical Chardonnay wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3973-3981.

Losada, M.M., López, J.F., Añón, A., Andrés, J., Revilla, E. (2012). Influence of some oenological practices on the aromatic and sensorial characteristics of white Verdejo wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1826-1834.

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferrerira, V. (2009). Fate of grape flavour precursors during storage on yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5468-5479.

**M**akhotkina, O., Pineau, B., Kilmartin, P.A. (2012). Effect of storage temperature on the chemical composition and sensory profile of Sauvignon Blanc wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18, 91-99.

Mangas, J.J., González, M.P., Blanco, D. (1993). Influence of cider-making technology on low-boiling-point volatile compounds. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Food Research and Techology*, 197, 522-524.

Mangas, J.J., González, M.P., Rodríguez, R., Blanco, D. (1996). Solid-Phase Extraction and determination of trace aroma and flavour components in cider by GC-MS. *Chromatographia*, 42, 101-105.

Mangas J.J., Moreno, J., Rodríguez, R., Picinelli, A., Suárez, B. (1999). Analysis of polysaccharides in cider. Their effect on sensory foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 452-456.

Margolles Cabrales, I., Arias Abrodo, P., Blanco Gomis, D. (2003). Influence of fatty acids on the foaming properties of cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6314-6316.

Marks, S.C., Mullen, W., Crozier, A. (2007). Flavonoid and hydroxycinnamate profiles of English apple ciders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8723-8730.

Martí, M.P., Mestres, M., Sala, C., Guasch, J. (2003). Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied

to the characterization of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7861-7865.

Masino, F., Montececchi, G., Arfelli, G., Antonelli, A. (2008). Evaluation of the combined effects of enzymatic treatment and ageing on lees on the aroma of wine from Bombino bianco grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9495-9501.

Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F., Prost, C. (2006). Characterization of odor-active volatiles in apples: influence of cultivars and maturity stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2678-2687.

Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T. (1991). *Introduction to Sensory Techniques. En: Sensory Evaluation Techniques, 2nd Edition*. Eds: Meilgaard, M.; Civille, G.V., Carr, B.T. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Mestres, M., Busto, O., Guash, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, 881, 569-581.

Métodos Oficiales de Análisis en la UE, Tomo II. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 1998.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 265-286.

Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. (2005). Aroma compounds as marked of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16, 333-338.

**N**oble, A.C., Ebeler, S.E. (2002). Use of multivariate statistics in understanding wine flavor. *Food Reviews International*, 18, 1-21.

Noguerol-Pato, R., González-Alvarez, M., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2012). Aroma profile of Garnacha Tintorera-based sweet wines by chromatographic and sensorial analyses. *Food Chemistry*, 134, 2313-2325.

Nurgel, C., Pickering, G.J., Inglis, D.L. (2004). Sensory and chemical characteristics of Canadian ice wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1675-1684.

**O**rden de 1 de agosto de 1979 por la que se reglamentan las sidras y otras bebidas derivadas de la manzana. (BOE núm. 206 de 28/08/1979, pp. 20172-20176).

Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas

chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205-214.

Ortega-Heras, M., Rivero-Pérez, M.D., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González, Sanjosé, M.L. (2008). Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*, 226, 1485-1493.

**P**ando Bedriñana, R.M., Lastra Queipo, A., Suárez Valles, B. (2012). Screening of enzymatic activities in non-*Saccharomyces* cider yeasts. *Journal of Food Biochemistry*, 36, 683-689.

Pando Bedriñana, R.M., Querol Simón, A., Suárez Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27, 503-508.

Parr, W., Green, J.A., Geoffrey-White, K., Sherlock, R.R. (2007). The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon blanc: Sensory characterisation by wine professionals. *Food Quality and Preference*, 18, 849-861.

Perestrelo, R., Fernandez, A., Albuquerque, F.F., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, 563, 154-164.

Pérez-Coello, M.S., González-Viñas, M.A., García-Romero, E., Díaz-Maroto, M.C., Cabezudo, M.D. (2003). Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. *Food Control*, 14, 301-306

Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2003). Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 697-705.

Pérez Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111, 447-456.

Pet'ka, J., Ferreira, V., González-Viñas, M.A., Cacho, J. (2006). Sensory and chemical characterization of the aroma of a white wine made with Devín grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 909-915.

Picinelli Lobo, A., Diñeiro García, Y., Mangas Sánchez, J., Rodríguez Madrera, R., Suárez Valles, B. (2009). Phenolic and antioxidant composition of cider. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 644-648.

Picinelli Lobo, A., Rodríguez Madrera, R., Mangas Alonso, J.J. (2005). A study of cider distillates using sensory and chromatographic data and chemometric analysis. *Journal of Food Science*, 70, S204-S207.

Picinelli, A., Suárez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L.M., Mangas, J.J. (2000). Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3997-4002.

Pietrowski, G.A.M., Eleutério dos Santos, C.M., Sauer, E., Wosiacki, G., Nogueira, A. (2012). Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. Yeast on the volatile profile of fermented apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9815-9821.

Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vicente, A.A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology Biotechnology* 98, 1937-1949

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J.M. (2009). Headspace solid-phase microextraction for direct determination of volatile phenols in cider. *Journal of Separation Science*, 32, 3746-3754.

Plutowska, B., Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages. A review. *Food Chemistry*, 107, 449-463.

Pollard, A., Kieser, M., Beech, F.W. (1966). Factors influencing the flavor of cider: the effect of fermentation treatments on fusel oil production. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 369-372.

Pozo-Bayón, M.A., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., Moreno-Arribas, M.V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved technology. *Trends in Food Science and Technology* 20, 289-299.

Pozo-Bayón, M.A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J., Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C. (2003). Influence of yeast strain, bentonite addition and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 273-278.

Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., Chassagne, D. (2008). Effects of yeast cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity on model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11854-11861.

**R**adu, J. (1999). La Mise au point d'un procédé de fabrication d'un cider de glace. Tesis doctoral, Université Laval.

Ramey, D.D., Ough, C.S. (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 928-934.

Reglamento de la Denominación de Origen Protegida "Sidra de Asturias". BOE núm. 36 de 11 de febrero de 2003.

Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95, 237-242.

Riu Aumatell, M., Miró, P., Serra-Cayuela, A., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2014). Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS. *Food Research International*, 57, 196-202.

Robinson, A.L., Boss, P.K., Heymann, H., Solomon, P.S., Trengove, R.D. (2011). Influence of yeast strain, canopy management, and site on the volatile composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines from Western Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3273-3284.

Rocha, S.M., Coutinho, P., Coelho, E., Barros, A.S., Delgadillo, I. (2010). Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1508-1516.

Rocha, S.M., Coutinho, P., Delgadillo, I., Dias Cardoso, A., Coimbra, M.A. (2005). Effect of enzymatic aroma release on the volatile compounds of white wines presenting different aroma potentials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 199-205.

Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S. (2010). Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. *European Food Research and Technology*, 230, 485-496.

Rodríguez Madrera, R., García Hevia, A., Palacios García, N., Suárez Valles, B. (2008). Evolution of aroma compounds in sparkling ciders (Champenoise method). *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 41, 2064-2069.

Rodríguez Madrera, R., Palacios García, N., García Hevia, A., Suárez Valles, B. (2005). Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor ester in cider. *Journal of Chromatography A*, 1069, 245-251.

Rodríguez Madrera, R., Pando Bedriñana, R., García Hevia, A., Bueno Arce, M. Suárez Valles, B. (2013). Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 623-631.

Rodríguez Madrera, R., Picinelli Lobo, A., Suárez Valles, B. (2006). Phenolic profile of Asturian (Spain) natural cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 120-124.

Rodríguez Madrera, R., Suárez Valles, B. (2011). Determination of volatile compounds in apple pomace by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS). *Journal of Food Science*, 76, C1326-C1334.

Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 283-289.

Romano, A., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., Sicard, S., de Revel, G. (2009). Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chemistry*, 114, 15-19.

Rossi, S., Sileoni, V., Peretti, G., Marconi, O. (2014). Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 919-928.

Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Papadopoulou, D. (2005). Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine. *Food Chemistry*, 93, 485-492.

Rubio Escalada, A. (2012). El sector de la sidra: Análisis económico y financiero. Trabajo presentado en la Facultad de Economía y Empresa, Universidad de Oviedo.

**S**aison, D., de Schutter, D.P., Uyttendhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavor of lager beer by studying their flavor thresholds. *Food Chemistry*, 114, 1206-1215.

Salih, A.G., Drilleau, J.F., Divies, C.; Lenzi, P. (1987). Les facteurs contributeurs au contrôle de la fermentation malolactique dans les cidres. *Science des Aliments* 7, 205-221.

Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto Hidalgo, M.C., González-Viñas, M.Á., Pérez-Coello, M.S. (2005). Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry*, 92, 627-635.

Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto, M. C., González Viñas, M. A., Soriano-Pérez, A., Pérez-Coello, M.S. (2007). Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control*, 18, 398-403.

San-Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., Escudero, A. (2011). Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7916-7924.

Satora, P., Sroka, P., Duda-Chodak, A., Tarko, T., Tuszynski, T. (2008). The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples. *Food Chemistry*, 111, 513-519.

Satora, P., Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Tuszynski, T., Czepielik, M. (2009). Influence of prefermentative treatments and fermentation on the

antioxidant and volatile profiles of apple wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11209-11217.

Schlosser, J., Reynolds, A.G., King, M., Cliff, M. (2005). Canadian terroir: sensory characterization of Chardonnay in the Niagara Peninsula. *Food Research International*, 38, 11-18.

Setkova, L., Risticovic, S., Pawliszyn, J. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*, 1147, 224-240.

Slater, K. (2010). A perspective on cider. Serie de Conferencias Cider and Fruit Wine: local but global, AICV, Bruselas.

Soares da Costa, M., Gonçalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pinho, P., Silva Ferreira, A.C. (2004). Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7911-7917.

Spranger, M.I., Clímaco, M.C., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, A., Leandro, M.C., Avelar, M.L., Belchior, A.P. (2004). Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 151-161.

Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernández Tascón, N., González García, A., Rodríguez Madrera, R. (2005). Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturias (Spain) apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 455-461.

Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernández Tascón, N., Querol Simón, A., Rodríguez Madrera, R. (2007a). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24, 25-31.

Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Lastra Queipo, A., Mangas Alonso, J.J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). *Food Microbiology*, 25, 690-697.

Sumby, K.M., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121, 1-16.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139-173

**T**ao, Y., García, J.F., Sun, D.W. (2014). Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 817-835.

Torchio, F., Río Segade, S., Gerbi, V., Cagnasso, E., Giordano, M., Giacosa, S., Rolle, L. (2012). Changes in varietal volatile composition during shelf-life of two types of aromatic red sweet Brachetto sparkling wines. *Food Research International* 48, 491-498.

Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2010). Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2455-2461.

Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, E., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 48-58.

Torresi, S., Frangipane, M.T., Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129, 1232-1241.

Tourila, H., Monteleone, E. (2009). Sensory food science in the changing society: Opportunities, needs and challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 54-62.

Tredoux, A., de Villiers, A., Májek, P., Lynen, F., Crouch, A., Sandra, P. (2008). Stir bar sorptive extraction combined with GC-MS analysis and chemometric methods for the classification of south African wines according to the volatile composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4286-4296.

Tufariello, M., Chiriatti, M.A., Grieco, F., Perrotta, C., Capone, S., Rampino, P., Tristezza, M., Mita, G., Grieco, F. (2014). Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile in Negroamaro wines, *LWT-Food Science and Technology*, 58, 35-48.

**U**gliano, M. (2013). Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6125-6136.

Ugliano, M., Moio, L. (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10134-10139.

**V**anbeneden, N., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2006). Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1136, 237-242.

Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2008a). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107, 221-230.



Vanbeneden, N., Saison, D., Delvaux, F., Delvaux F.R. (2008b). Decrease of 4-vinilguayacol during beer aging and formation of apocynol and vanillin in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11983-11988.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2003). Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6782-3790.

Vasserot, Y., Steinmetz, V., Jeandet, P. (2003). Study of thiol consumption by yeast lees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 201-207.

Vidrih, R., Hribar, J. (1999). Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry*, 67, 287-294.

Villière, A., Arvisenet, G., Lethuaut, L., Prost, C., Sérot, T. (2012). Selection of a representative extraction method for the analysis of odourant volatile composition of French cider by GC-MS-O and GC-TOF-MS. *Food Chemistry*, 131, 1561-1568.

**W**ang, H., Reitmeier, C.A., Glatz, B.A., Carriquiry, A.L. (2003). Mixed model analysis of sensory characteristics of irradiated apple cider. *Journal of Food Science* 68, 1498-1503.

Wang, L., Xu, Y., Zhao, G., Li, J. (2004). Rapid analysis of flavour volatiles in apple wine using Headspace Solid-Phase Microextraction. *Journal of the Institute of Brewing*, 110, 57-65.

Wang, W., Xu, Y., Yu, A. (2006). Influence of oak chips geographical origin, toast level, dosage and aging time on volatile compounds of apple cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 112, 255-263.

Williams, A. A. (1974). Flavour research and the cider industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 80, 455-470.

Williams, A.A. (1975). The development of a vocabulary and profile assessment method for evaluating the flavor contribution of cider and perry aroma constituents. *Journal of Science of Food Agriculture*, 26, 567-582.

Williams, A.A., May, H.V. (1981). Examination of an extract of cider volatiles using both electron impact and chemical ionization GC-MS. *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 372-375.

Williams, A.A., May, H.V., Tucknott, O.G. (1978). Examination of fermented cider volatiles following concentration on the porous polymer Porapak Q. *Journal of the Institute of Brewing*, 84, 97-100.

Williams, A. A., Tucknott, O. G. (1971). Volatile constituents of fermented cider I.-Draught dry cider blend. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 264-269.

Williams, A.A., Tucknott, O.G. (1978). The volatile aroma components of fermented ciders: minor neutral components from the fermentation of Sweet Coppin Apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 381-397.

**X**u, Y., Fan, W., Qian, M.C. (2007). Characterization of aroma compounds in apple cider using Solvent-Assisted Flavour Evaporation and Head-Space Solid-Phase Microextraction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 3051-3057

Xu, Y., Zhao, G., Par, H., Li, J. (2005). Effects of inhibitory environmental factor on growth of *Oenococcus Oeni* CCSYU2068 for malolactic fermentation of cider productions. *Journal of the Institute of Brewing*, 111, 223-228.

Xu, Y., Zhao, G.A., Wang, L.P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 33, 192-196.



## **Anexos**

---



# Aromatic Profile of Ciders by Chemical Quantitative, Gas Chromatography-Olfactometry, and Sensory Analysis

María José Antón, Belén Suárez Valles, Ana García Hevia, and Anna Picinelli Lobo

**Abstract:** Nine samples of Asturias cider have been analyzed for volatile, olfactometric, and sensorial profiles. The aromatic composition was mainly constituted by fusel alcohols and ethyl esters. Among the minor volatile compounds, fatty acids, volatile phenols, and alcohols were the main components. The olfactometric analysis revealed the existence of 55 aromatic areas, exhibiting a wide range of intensities. Components like amyl alcohols, 2-phenylethanol, ethyl esters such as 2-methylbutyrate, hexanoate and octanoate, hexanoic and octanoic acids 2-phenylethyl acetate, 4-ethyl guaiacol, and 4-ethyl phenol could be considered as being part of the structure of cider aroma. The extract dilution analysis of one extract identified 2 volatile phenols (4-ethyl guaiacol and 4-ethyl phenol) among the most powerful odorants in cider. These components gave significant correlations with the sensory attributes sweet, spicy, and lees.

**Keywords:** aromas, chemical composition, cider, GC-olfactometry, sensory evaluation

**Practical Application:** Although cider is a popular and worldwide beverage, only a few and partial studies have been focused to the knowledge of its aromatic composition. However, the characteristic aroma profile of cider suggests that some concepts relating high contents of volatile phenols or acetic acid with sensory defects should be revised in the case of this beverage.

## Introduction

Odor and flavor are the most important quality factors in an alcoholic beverage, and they are closely related to the making procedure. Therefore, the study of the aroma of foods and beverages is a challenging but difficult task, involving gas chromatographic, olfactometry, and sensory techniques.

Cider-making is one of the most relevant agro-food industries in Asturias, a region located on the Atlantic coast of northern Spain. Production rates of cider (sparkling and still cider) place this region in the 4th position of Europe, following the United Kingdom, Ireland, and France (<http://www.aicv.org>). This product is recognized as Protected Designation of Origin by the European Union (Commission Regulation Nr. 2154/2005), and takes into account 2 products: still and sparkling cider. The making of cider follows a traditional method which includes pressing of cider apples and spontaneous alcoholic fermentation and malolactic transformation by the autochthonous microorganisms typically associated to each cellar year after year (Suárez-Valles and others 2007a), giving rise to characteristic cellar profiles. Although cider is a popular and well-known beverage in Europe, to the best of our knowledge there are only a few quantitative studies about its aroma profile. The volatile composition of cider is characterized by the presence of fusel alcohols, ethyl acetate, and ethyl lactate as major compounds (Picinelli and others 2000), together with short- and medium-chain fatty acids, esters, and carbonyls (Mangas and others 1996; Wang and others 2004; Rodríguez

Madrera and others 2005; Xu and others 2007; Rodríguez Madrera and others 2008; Satora and others 2008, 2009). Moreover, olfactometric researches on cider aroma are even scarcer. For instance, Xu and others (2007) described the olfactometric profiles of 2 single-cultivar apple ciders by measuring olfactory intensities, comparing the results obtained by using different methods for the extraction of the volatile compounds and Villière and others (2012) compared 2 headspace methods to identify odor active compounds in sweet commercial French ciders.

The aims of this paper were to quantify the aromatic composition of natural cider to seek for odor-active and potentially discriminatory compounds in cider on the basis of their olfactometric and sensory profiles. To measure the olfactometric data, a technique combining detection frequency and odor intensity of the eluting components was chosen.

## Materials and Methods

### Cider samples

Nine samples of cider (6 bottles each) made in the 2008 harvest were taken at bottling at their respective cellars and kept at 12 °C until chemical and sensory analysis, for a maximum of 1 mo. These ciders were made with different apple mixtures, according to the particular conditions used by the respective cider makers, under the rules of the Protected Designation of Origin regulation. They were obtained by spontaneous fermentations excepting those referred to as C4, C6, and C10, which were made by using commercial *Saccharomyces* strains. The chemical composition of these samples, obtained by MID-FTIR spectroscopy (Picinelli and others 2006), is shown in Table 1.

MS 20130901 Submitted 7/2/2013, Accepted 10/31/2013. Authors are with Area of Food Technology, SERIDA, Carretera de Oviedo s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, Spain. Direct inquiries to author Picinelli Lobo (E-mail: [apicinelli@serida.org](mailto:apicinelli@serida.org)).

## Aromas of cider ...

**Table 1—Chemical composition of ciders.**

	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C23	C24
Alcoholic degree (% v/v)	6.08	5.60	6.04	5.98	6.64	6.50	6.49	6.44	7.24
Total dry extract (g/L)	21.8	24.7	24.1	27.0	24.4	24.9	23.9	22.2	25.3
pH	3.64	3.53	3.71	3.69	3.81	3.83	3.85	3.76	3.73
Volatile acidity (g acetic/L)	0.28	0.26	1.18	0.67	1.63	0.37	1.15	1.83	1.68
Total acidity (g sulfuric/L)	2.69	3.44	4.06	3.26	3.72	2.59	3.63	4.28	3.73
Lactic acid (g/L)	5.3	6.7	6.2	6.2	5.0	5.6	5.7	6.4	4.9
1,3-Propanediol (g/L)	nd	nd	1.6	0.3	1.0	nd	1.3	2.1	0.2
Glycerol (g/L)	4.3	4.0	2.2	3.4	3.8	4.3	2.4	0.7	4.0
Sorbitol (g/L)	6.4	7.8	8.3	7.5	7.2	8.9	8.6	8.1	5.3

nd, not detected.

**Table 2—References for sensory attributes of cider<sup>a</sup>.**

Attributes	Consensus definition	References
Fruity	Ripe fruit, ripe apple	Ethyl 2-methylbutyrate, 2 mg/L
Floral	Floral, roses	2-Phenylethanol, 100 mg/L
Sweet	Sweet, cake-like	Vanillin, 200 mg/L
Lactic	Lactic	Acetoin, 100 mg/L + 2-methylbutyric acid, 5mg/L

<sup>a</sup>Solutions prepared in ethanol:water (6:94).

### Reagents and standards

The volatile standards were supplied by Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.), Aldrich (Gillingham, U.K.), and Flucka (Buchs, Switzerland). Pentane (VWR, Hipersolv, Darmstadt, Germany), dichloromethane (chromatographic quality), absolute ethanol, ammonium sulfate, and anhydrous sodium sulfate were from Pan-react (Barcelona, Spain). All the reagents were of chromatographic quality.

### Sensory analysis

Eight judges (4 men and 4 women aged from 25 to 50), belonging to the Sensory Panel of the Protected Designation of Origin “Cider from Asturias” were selected and trained for sensory descriptive analysis according to the specifications of the Spanish Assn. for Normalization (AENOR 1997). This group completed 60 h of specific training with natural ciders and references to clarify definitions, as described in Table 2.

The trained panel was scheduled to assess the samples once a week. The ciders were kept and served at 12 °C, randomly presented in normalized glasses (UNE 87021), and evaluated in duplicate. A maximum of 8 glasses were assayed in each session. Ten odor and flavor different attributes (fruity, floral, sweet, lactic, spicy, vinegar, lees, acid, bitter, and astringent) were evaluated by means of a 9-point scale (1, very weak; 5, moderate; 9, very strong). Assessments for odor, aroma, taste, and after-taste qualities were also done on a 9-point scale defined in this way: 1, very bad; 5, fair; 9, excellent.

### Analysis of major volatiles compounds

Major volatiles (acetaldehyde, methanol, acrolein, ethyl acetate, 1-propanol, *iso*-butanol, 2-butanol, acetoin, amyl alcohols, allyl alcohol, ethyl lactate, and 2-phenylethanol) were analyzed by direct injection into a Hewlett-Packard model 6890 (Agilent Tech-

nologies, Palo Alto, Calif., U.S.A.) GC-FID as described elsewhere (Suárez Valles and others 2005).

### Analysis of minor volatiles compounds

Minor volatile 8 alcohols (3-methyl-3-butenol, 1-pentanol, 3-methyl-2-butenol, 3-methyl-1-pentanol, hexanol, *trans*-3-hexenol, *cis*-3-hexenol, and benzyl alcohol), 5 ethyl esters (2-methylbutyrate, hexanoate, octanoate, 3-hydroxybutyrate, and 4-hydroxybutyrate), 3 fatty acids (hexanoic, octanoic, and decanoic), 2 acetate esters (isoamyl and 2-phenylethyl), 4 volatile phenols (4-ethylguaiaicol, 4-ethylphenol, 4-vinylguaiaicol, and 4-ethylcatechol), 3-ethoxy-1-propanol,  $\gamma$ -butyrolactone, and methionol were analyzed by GC-FID, after an isolation and concentration step by liquid-liquid extraction.

Cider samples were filtered through hydrophilic cotton and homogenized by magnetic stirring for 2 min. Forty-five grams of ammonium sulfate were added to a volume of 150 mL of sample, adjusting the pH to 3.00 with hydrochloric acid. Then, one-step liquid-liquid extraction was performed in 250-mL decantation funnels with 30 mL of a pentane:dichloromethane (2:1, v/v) mixture, shaking for 10 min at room temperature. Aqueous phase was discarded and then, the funnel was washed with 5 mL of the extractant mixture, and added to the organic phase. This one was centrifuged at 20000 *g* at 5 °C for 10 min. Next, 20 mL of the organic phase was collected, filtered through filter paper (Whatman 1PS silicone treated) and anhydrous sodium sulfate, washed with the extractant mixture, and subsequently concentrated by means of a Turbo Vap II<sup>TM</sup> Evaporator (Zymark, Caliper Life Sciences, Mass., U.S.A.) at 30 °C under nitrogen gas flow to a final volume of 0.5 mL. Sample extracts were filtered through a 0.45  $\mu$ m PVDF (polyvinylidene difluoride; Teknokroma, Barcelona, Spain) before chromatographic analysis.

The chromatographic analyses were performed with a Hewlett-Packard 6890N model fitted with a flame ionization detector, a DB-WAX column (30 m  $\times$  0.32 mm., 0.50  $\mu$ m, J&W Folsom, Calif., U.S.A.), using helium as carrier gas (3 mL/min). Chromatographic conditions were as follows: initial temperature, 40 °C maintained for 5 min, then, program rate 3 °C/min to achieve 135 °C, 1 °C/min to reach a final temperature of 225 °C, and kept at this temperature for 5 min. Injector and detector temperatures, 275 °C. Injection volume, 1  $\mu$ L (split ratio 1/50). Quantification was done by the external standard procedure. The standard solutions were prepared in a pentane:dichloromethane (2:1, v/v) mixture.

Additionally, to confirm the identity of the volatile compounds and the absence of interferences and coeluting peaks, the samples were injected onto an Agilent 7890 GC model, fitted with a mass spectrometry detector 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., U.S.A.), using the above-mentioned chromatographic conditions, and the total ion mode (SCAN) in the range *m/z* 40 to 400 (2.6 scan/s). The identification of volatile compounds was performed by comparing their spectra against the library Wiley 138, and confirmed by coinjection of the pure standards, whenever possible. Injection volume, 1  $\mu$ L, was done in the splitless mode (1.0 min).

### Olfactometric analysis

Olfactometric analyses were done by means of a Hewlett-Packard 5890 model fitted with a flame ionization detector and a sniffing port 275 (Ingeniería Analítica, S.L., Barcelona, Spain) heated at 220 °C, connected by a flow splitter to the exit of a

## Aromas of cider . . .

DB-WAX column (30 m × 0.32 mm; 0.50 μm from J&W Folsom, Calif., U.S.A.). Gradient conditions were as follows: starting at 40 °C for 5 min, rising to 100 °C at 4 °C/min, 2nd step 6 °C/min to reach 200 °C, isocratic step at this temperature for 4 min, 10 °C/min to reach a final temperature of 225 °C, maintained for 5 min. Injector and detector temperatures, 275 °C. Injection volume 1 μL (splitless 1.0 min).

A panel of 6 to 8 people carried out the sniffings of the aforementioned cider extracts. Each judge evaluated the samples once (35 min). The overall intensity of each odor was measured using a 5-point scale (1, very weak; 3, clearly recognizable, but moderate intensity; 5, very intense odor), with 9 possible scores (half values were allowed). The data processed were a mixture of intensity and frequency of detection, named modified frequency, MF, calculated with the formula proposed by Dravnieks (1985):  $MF (\%) = \sqrt{F(\%) \times I(\%)}$ , where  $F(\%)$  is the detection frequency, and  $I(\%)$  the average intensity, expressed as percentage of the maximum intensity.

The identification of the odorants was carried out by comparison of their odors, by chromatographic retention index with those of the pure reference standards in both DB-WAX and DB-5 columns (30 m × 0.32 mm; 0.25 μm from J&W Folsom, Calif., U.S.A.), and GC-MS spectra in the conditions established for olfactometric analyses.

## Statistical analysis

To assess the influence of the cider samples, the quantitative data were submitted to variance analyses. Sensory data were evaluated by multivariate analysis of variance, taking ciders and judges as factors. To check the existence of significant differences among samples, GC/O data were submitted to 2 analyses: a  $\chi^2$  test on the citation data, and a variance analysis on the individual intensity scores. Pearson bivariate correlation analyses were also performed to seek for significant correlations between olfactometric intensities and the logarithm of concentrations of minor volatiles plus amyl alcohols and 2-phenylethanol. In all the cases, a significant level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ) was selected. The statistical package used was SPSS v. 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., U.S.A.).

## Results and Discussion

## Sensory profiles

Sensory data were evaluated by analysis of variance taking a significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ). The sensory panel disagreed in the use of the quantitative scales as the effect of judges was significant for most of the attributes; however, they were consistent at evaluating floral and lees because the interaction samples × judges were not significant (data not shown). In those cases in which significant interactions were found, a mixed model was considered, taking judges as a random effect. Thus, the  $F$ -value was calculated by dividing the mean square of cider samples by the mean square of the corresponding samples-by-judges interactions.

There were found significant differences among samples for the attributes fruity, floral, lactic, and lees. As seen in Figure 1, the samples referred to as 9, 11, and 3 had the highest scores for fruity; the cider referred to as 9 was also the most floral, sweet, and spicy, whereas sample referred to as 23 had the highest score for the attribute lees, followed by cider 10. No significant differences were found for any of the rest of the attributes. In general, these ciders were described as moderate for acid taste and weak in bitterness and astringency. It is worth to note that the vinegar sensation

was assessed as weak or very weak, even though the wide range observed for volatile acidity (Table 1).

The samples were also assessed for odor and flavor quality. Pearson analyses of correlation gave several significant correlations ( $P \leq 0.05$ ) among sensory attributes. Odor quality showed positive correlations with fruity, floral, and taste quality. In its turn, fruity was positively correlated with the attributes floral, sweet, and spicy, whereas the lactic odor exhibited negative correlations with odor and taste qualities and floral.

## Quantitative aromatic profiles of ciders

The results obtained from the analyses of major volatile compounds by direct injection are summarized in Table 3. Among those compounds, it is worth to note the contents of 2-phenylethanol and amyl alcohols, with mean values of 107 and 214 mg/L respectively. Both of them are products of the alcoholic fermentation, and their contents depend on the technological conditions, such as turbidity of the musts and the making process, and the yeast strains involved in the fermentation process (Mangas and others 1993; Vidrih and others 1999; Suárez and others 2007b). Methanol, *iso*-butanol, and 1-propanol presented also significant amounts. The contents of methanol in cider are related to apple cultivar and maturity, as it is the result of pectin methyl esterase action on methoxy groups of pectins in the crushed fruit. The other 2 components are typical fermentation products, and depend on the yeast strains conducting the fermentation (Antonelli and others 1999; Satora and others 2009).

Among the minor volatile compounds, fatty acids represent 43% of the aromatic composition. Octanoic acid was the major one, followed by hexanoic and decanoic acids. The contents found in these samples were included in the range between 0.2 and 11 mg/L, with mean values similar to those described elsewhere (Mangas and others 1996; Blanco-Gomis and others 2001; Wang and others 2004). The fatty acids present in cider come from apples, their profile being related to apple cultivars and harvests (Blanco-Gomis and others 2002); alcoholic fermentation provides also a certain amount of fatty acids, which depends on the yeast strains involved in the fermentation (Arias-Abrodo and others 2005).

Volatile phenols and alcohols, respectively, account for 24% and 23% of the minor aromatic composition. Among the alcohols analyzed, hexanol was the main one, with contents ranging between 2.7 and 7.6 mg/L, similar to those reported for ciders made from single varieties (Wang and others 2004; Satora and others 2009). Other C6-alcohols analyzed were *cis*-3-hexenol and *trans*-3-hexenol, the 1st one being more important from the quantitative point of view (Table 3). Both of them had been described in apple extracts and ciders, imparting floral and herbaceous odors (Mehinagic and others 2006; Xu and others 2007). Other alcohols such as 1-pentanol and benzyl alcohol have been reported in cider extracts (Williams and May 1981).

Four volatile phenols were quantified in the ciders studied: 4-ethylguaiacol (4-EG), 4-ethylphenol (4-EP), 4-vinylguaiacol (4-VG), and 4-ethylcatechol (4-EC). Their mean contents decreased in the order  $4-EC \geq 4-EP > 4-VG > 4-EG$ . Comparing the values obtained for the Asturian ciders with those reported for French ciders (Buron and others 2011a), some differences can be highlighted. The Asturian ciders presented higher levels of 4-EP and lower of 4-EC than French ones. In any case, the high contents of both 4-EP and 4-EC in ciders is related to the metabolism of lactobacilli, in particular, some strains of *Lactobacillus paracollinoides*,



## Aromas of cider ...

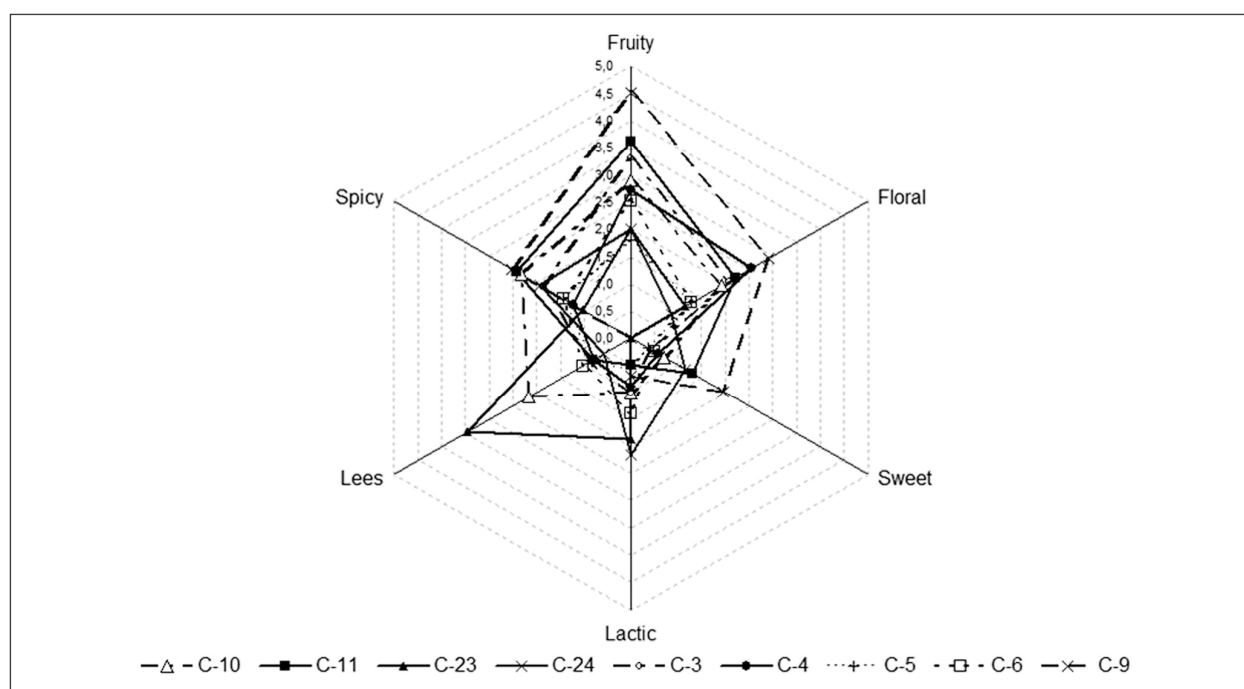


Figure 1—Spider graphs of the sensory profiles of ciders. Scores shown are mean values of the sensory panel.

which are able to synthesize those components from hydroxycinnamic acids (Buron and others 2011b).

Although volatile phenols are considered as markers of sensory defects, this concept should be revised because despite the high contents of volatile phenols found in the ciders analyzed, none of them presented this defective character. As reported elsewhere (Buron and others 2011a), a clear phenolic taint off-flavor was not perceived until a 4-EC concentration of 11.8 mg/L was achieved.

Ethyl and acetate esters represent the 5% of the minor aromatic fraction analyzed in these ciders. Among the ethyl esters, 4-hydroxybutyrate and octanoate reached the higher amounts, whereas isoamyl acetate was the major one between the analyzed acetates (Table 3). The present data are slightly lower than those observed in previous studies on Asturian ciders (Mangas and others 1996; Rodríguez Madrera and others 2005). These compounds are synthesized from alcohol and acids at different stages of the fermentation process, by the action of yeasts and lactic bacteria, or by chemical esterification during the ageing time. For instance, ethyl octanoate and ethyl hexanoate contents are influenced by the time of contact with lees (Rodríguez Madrera and others 2008). Therefore, the ester profiles are subjected to continuous changes due to the complexity of cider.

### Olfactometric profiles of ciders

The results from the GC-O study of the ciders are presented in Table 4. In these ciders, 128 odorants were initially detected, but those not reaching a maximum GC-O score of 30% MF in any of the 9 ciders were not further considered. According to this criterion, the final number of components was reduced to 55, subsequently ranked and statistically evaluated. Among the components identified by olfactometry, alcohols were the most abundant, followed by ethyl esters and volatile phenols, acids, and acetate esters. All these compounds have long been reported in cider (Williams and Tucknott 1978; Williams and May 1981),

cider distillates (Ledauphin and others 2003), and more recently in ciders made from Fuji (Wang and others 2004) and Chinese apple varieties (Xu and others 2007) prepared at laboratory scale, and sweet French commercial ciders (Villière and others 2012).

Two groups of odorants can be made, attending to their mean MF (%) value. In the 1st one, there were 20 components with average modified frequencies between 50% and 78%, and therefore, clearly perceived in all of the ciders; these compounds included different fermentation by-products (amyl alcohols, 2-phenylethanol, fatty acids) and volatile phenols, and they were present in a wide range of concentrations, as seen in Table 3. The highest mean value for MF corresponded to that of 4-EG and 2-methylbutyric acid (78%), followed by 2-phenylethanol (75%). In general terms, the results obtained in this set of Asturian ciders were in agreement with those reported for other ciders (Xu and others 2007); it is worth to note that many of the odorants presenting MF  $\geq$  50% in this study exhibited also the highest aroma intensities in the above-mentioned report, such as ethyl esters (2-methylbutyrate, hexanoate, and octanoate), acids (2-methylbutyric, hexanoic, and octanoic), amyl alcohols and 2-phenylethanol, 2-ethylphenyl acetate, 1-octen-3-one, and volatile phenols (4-EG and 4-EP). Therefore, these compounds could be considered as part of the structural aroma of cider.

In the 2nd group, there were 35 odorants with average MF up to 46%. Again, another volatile phenol, 4-VG, reached the highest value for mean MF (46%). Most of the odorants included in this group (24) were not perceived in some of the samples, but some of them reached very high values for MF.

The ability of the odorants considered in this study to discriminate among ciders was evaluated through variance analyses of the individual intensities assigned by the participants in the sniffing sessions (ANOVA),  $\chi^2$  on the citation frequencies, and the range of the olfactometric measures (MF<sub>max</sub>-MF<sub>min</sub>). As shown in Table 4, 23 out of 35 components included in the 2nd group,

## Aromas of cider...

Table 3-Volatile composition of ciders.

	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C23	C24	Mean	SD
<b>Major volatiles (mg/L)</b>											
Ethyl acetate	38 <sup>c</sup>	17 <sup>a</sup>	64 <sup>f</sup>	45 <sup>d</sup>	81 <sup>h</sup>	33 <sup>b</sup>	72 <sup>g</sup>	55 <sup>e</sup>	123 <sup>i</sup>	59	31
Methanol	31 <sup>c</sup>	35 <sup>d</sup>	34 <sup>cd</sup>	17 <sup>a</sup>	64 <sup>g</sup>	28 <sup>b</sup>	54 <sup>f</sup>	44 <sup>e</sup>	130 <sup>h</sup>	49	34
1-Propanol	10 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	43 <sup>f</sup>	12 <sup>b</sup>	33 <sup>e</sup>	13 <sup>b</sup>	19 <sup>c</sup>	45 <sup>g</sup>	24 <sup>d</sup>	23	14
<i>Iso</i> -Butanol	51 <sup>e</sup>	32 <sup>c</sup>	97 <sup>g</sup>	25 <sup>a</sup>	33 <sup>c</sup>	45 <sup>d</sup>	61 <sup>f</sup>	28 <sup>b</sup>	102 <sup>h</sup>	53	29
Allyl alcohol	nd	nd	17 <sup>c</sup>	nd	4 <sup>a</sup>	nd	29 <sup>d</sup>	7 <sup>b</sup>	nd	6	11
1-Butanol	4 <sup>a</sup>	nd	nd	2 <sup>a</sup>	6 <sup>c</sup>	2 <sup>a</sup>	6 <sup>bc</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	3	2
Amyl alcohols	255 <sup>g</sup>	168 <sup>b</sup>	301 <sup>h</sup>	126 <sup>a</sup>	168 <sup>b</sup>	246 <sup>f</sup>	237 <sup>e</sup>	211 <sup>c</sup>	218 <sup>d</sup>	214	53
Ethyl lactate	231 <sup>g</sup>	132 <sup>b</sup>	166 <sup>d</sup>	201 <sup>f</sup>	188 <sup>e</sup>	209 <sup>f</sup>	117 <sup>a</sup>	141 <sup>c</sup>	258 <sup>h</sup>	183	47
2-Phenyl ethanol	152 <sup>f</sup>	17 <sup>a</sup>	156 <sup>g</sup>	16 <sup>a</sup>	86 <sup>c</sup>	137 <sup>e</sup>	128 <sup>d</sup>	244 <sup>h</sup>	25 <sup>b</sup>	107	78
<b>Minor volatiles (µg/L)</b>											
<b>Fatty acids</b>											
Hexanoic	2,544 <sup>b</sup>	4,375 <sup>c</sup>	2,919 <sup>c</sup>	4,247 <sup>c</sup>	2,837 <sup>c</sup>	1,774 <sup>a</sup>	2,836 <sup>c</sup>	5,170 <sup>f</sup>	3,845 <sup>d</sup>	3,394	1,074
Octanoic	4,737 <sup>de</sup>	5,975 <sup>f</sup>	4,301 <sup>cd</sup>	4,790 <sup>e</sup>	3,384 <sup>b</sup>	3,976 <sup>c</sup>	6,127 <sup>f</sup>	11,072 <sup>g</sup>	2,162 <sup>a</sup>	5,169	2,528
Decanoic	1,581 <sup>d</sup>	1,058 <sup>b</sup>	1,211 <sup>c</sup>	1,011 <sup>b</sup>	1,333 <sup>c</sup>	1,591 <sup>d</sup>	2,271 <sup>c</sup>	4,331 <sup>f</sup>	<320	1,626	1,151
<b>Volatile phenols</b>											
4-ethyl guaiacol	643 <sup>d</sup>	265 <sup>b</sup>	637 <sup>d</sup>	1,529 <sup>f</sup>	1,080 <sup>e</sup>	93 <sup>a</sup>	477 <sup>c</sup>	128 <sup>a</sup>	226 <sup>b</sup>	564	479
4-ethyl phenol	1,371 <sup>a</sup>	2,509 <sup>d</sup>	1,723 <sup>b</sup>	2,856 <sup>e</sup>	3,181 <sup>f</sup>	1,616 <sup>b</sup>	2,308 <sup>c</sup>	2,926 <sup>e</sup>	1,317 <sup>a</sup>	2,200	712
4-vinyl guaiacol	355 <sup>bc</sup>	1,235 <sup>e</sup>	609 <sup>d</sup>	329 <sup>b</sup>	411 <sup>c</sup>	1,229 <sup>e</sup>	144 <sup>a</sup>	2,428 <sup>f</sup>	307 <sup>b</sup>	783	733
4-ethyl catechol	504 <sup>a</sup>	617 <sup>a</sup>	586 <sup>a</sup>	3,296 <sup>c</sup>	6,929 <sup>d</sup>	442 <sup>a</sup>	3,401 <sup>c</sup>	3,427 <sup>c</sup>	1,180 <sup>b</sup>	2,264	2,196
<b>Alcohols</b>											
3-Methyl-3-butenol	<18	<18	24 <sup>c</sup>	18 <sup>c</sup>	33 <sup>g</sup>	<18	19 <sup>d</sup>	43 <sup>h</sup>	29 <sup>f</sup>	22	11
1-Pentanol	45 <sup>c</sup>	37 <sup>b</sup>	54 <sup>d</sup>	39 <sup>b</sup>	110 <sup>e</sup>	35 <sup>b</sup>	<12	219 <sup>f</sup>	108 <sup>e</sup>	72	65
3-Methyl-2-butenol	14 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	41 <sup>c</sup>	17 <sup>c</sup>	41 <sup>c</sup>	17 <sup>c</sup>	34 <sup>d</sup>	72 <sup>f</sup>	33 <sup>d</sup>	31	19
3-Methyl-1-pentanol	43 <sup>c</sup>	8	35 <sup>d</sup>	9 <sup>a</sup>	41 <sup>c</sup>	23 <sup>c</sup>	48 <sup>f</sup>	93 <sup>g</sup>	20 <sup>b</sup>	36	26
Hexanol	3,646 <sup>b</sup>	3,910 <sup>bc</sup>	4,394 <sup>cd</sup>	5,736 <sup>f</sup>	5,266 <sup>ef</sup>	2,746 <sup>a</sup>	4,245 <sup>c</sup>	7,638 <sup>g</sup>	4,831 <sup>de</sup>	4,712	1,409
<i>trans</i> -3-Hexenol	23 <sup>b</sup>	41 <sup>f</sup>	34 <sup>d</sup>	37 <sup>e</sup>	30 <sup>c</sup>	18 <sup>a</sup>	40 <sup>f</sup>	51 <sup>g</sup>	34 <sup>d</sup>	34	10
<i>cis</i> -3-Hexenol	421 <sup>f</sup>	103 <sup>a</sup>	274 <sup>d</sup>	341 <sup>e</sup>	177 <sup>b</sup>	216 <sup>c</sup>	185 <sup>b</sup>	548 <sup>g</sup>	190 <sup>b</sup>	273	141
Benzyl alcohol	64 <sup>ab</sup>	55 <sup>a</sup>	321 <sup>g</sup>	78 <sup>b</sup>	267 <sup>f</sup>	141 <sup>c</sup>	219 <sup>d</sup>	374 <sup>h</sup>	240 <sup>e</sup>	195	117
<b>Ethyl esters</b>											
2-Methylbutyrate	9 <sup>ab</sup>	7 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	23 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>	10 <sup>b</sup>	29 <sup>d</sup>	35 <sup>e</sup>	33 <sup>e</sup>	21	11
Hexanoate	105 <sup>b</sup>	204 <sup>f</sup>	131 <sup>c</sup>	229 <sup>g</sup>	132 <sup>c</sup>	91 <sup>a</sup>	148 <sup>d</sup>	217 <sup>g</sup>	168 <sup>e</sup>	158	49
Octanoate	158 <sup>d</sup>	181 <sup>c</sup>	172 <sup>c</sup>	172 <sup>c</sup>	144 <sup>c</sup>	132 <sup>b</sup>	203 <sup>f</sup>	324 <sup>g</sup>	102 <sup>a</sup>	176	63
3-Hydroxybutyrate	18 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	44 <sup>c</sup>	124 <sup>f</sup>	18 <sup>b</sup>	68 <sup>d</sup>	99 <sup>e</sup>	120 <sup>f</sup>	57	47
4-Hydroxybutyrate*	239 <sup>c</sup>	262 <sup>d</sup>	446 <sup>f</sup>	283 <sup>d</sup>	610 <sup>g</sup>	174 <sup>a</sup>	377 <sup>e</sup>	379 <sup>e</sup>	217 <sup>b</sup>	332	136
<b>Acetate esters</b>											
Isoamyl	428 <sup>e</sup>	389 <sup>d</sup>	472 <sup>f</sup>	77 <sup>a</sup>	199 <sup>b</sup>	396 <sup>d</sup>	370 <sup>d</sup>	528 <sup>g</sup>	314 <sup>c</sup>	353	139
2-Phenyl ethyl	478 <sup>h</sup>	41 <sup>d</sup>	167 <sup>f</sup>	<18	84 <sup>c</sup>	55 <sup>cd</sup>	72 <sup>de</sup>	208 <sup>g</sup>	24 <sup>b</sup>	126	147
<b>Others</b>											
3-Ethoxy-1-propanol	39 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	312 <sup>c</sup>	84 <sup>b</sup>	179 <sup>c</sup>	97 <sup>b</sup>	748 <sup>g</sup>	364 <sup>f</sup>	252 <sup>d</sup>	234	226
$\gamma$ -Butyrolactone	1,879 <sup>d</sup>	3,864 <sup>f</sup>	2,567 <sup>e</sup>	3,804 <sup>f</sup>	1,485 <sup>c</sup>	1,008 <sup>b</sup>	850 <sup>b</sup>	361 <sup>a</sup>	1,437 <sup>e</sup>	1,917	1,254
Methionol	557 <sup>c</sup>	622 <sup>d</sup>	1,012 <sup>h</sup>	418 <sup>b</sup>	360 <sup>a</sup>	710 <sup>c</sup>	363 <sup>a</sup>	933 <sup>g</sup>	785 <sup>f</sup>	640	240

nd, not detected; \*quantified as ethyl 3-hydroxybutyrate. Values with different letters in the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

and 5 out of 20 of those present in the 1st one, were found to be potentially differentiating, as measured by both statistical tests. The  $\chi^2$  showed significant differences for other 5 compounds (4-EG, sotolon, *p*-cresol, *m*-cresol, and  $\gamma$ -decalactone). Likewise, all the above potentially discriminatory compounds exhibited ranges of their modified frequencies higher or equal to 30%, excepting 4-EG. However, the opposite was not always true since 10 components, which are written in bold letters in Table 4, did not significantly discriminate among ciders, despite their high ranges for MF (%). The intrinsic properties of the components analyzed may explain some of the difficulties found to discriminate between stimulus levels. In the case of methionol, its olfactory signal becomes saturated at concentrations only 10-fold its perception threshold (Culleré and others 2004). The opposite situation was represented by ethyl propionate, isoamyl acetate, and hexanol, producing transitory stimulus, with low to medium olfactory intensities.

In order to identify the most powerful odorants, the cider referred to as C3 was selected on the basis of its high odor intensity

and quality (data not shown) to perform an AEDA study. To do so, the extract was sequentially diluted by a rate of 2 with the extractant mixture, analyzed by the 5 most sensitive judges, and the citation frequencies being measured. The flavor dilution factor of each odorant corresponds to the maximum dilution that could be perceived by at least one of the panelists, and it is shown in the last column of Table 4.

According to the results of this experiment, 28 components had values for DF different from zero. The most powerful odorants were 2-phenylethanol, 4-EG and 4-EP, followed by amyl alcohols, *trans*-3-hexenol, 2-methylbutyric acid, and octanoic acid. Other odorants such as sotolon, methionol, ethyl octanoate, 3-methyl-2-butenol, and 4-VG had also noticeable values for dilution factors. Taking apart 2-phenylethanol and amyl alcohols, being major components of the volatile profile of cider, the other compounds can be considered as potentially active odorants of this beverage. Likewise, it is worth to note that 4 of these potentially active compounds were also identified as discriminatory: 4-EG, octanoic acid, ethyl octanoate, and 4-VG (Table 4).

## Aromas of cider ...

**Table 4—Olfactometric profiles of ciders: olfactory description, chemical identification, modified frequencies, MF (%), and AEDA dilution factors (DF).**

LRI <sub>WAX</sub>	LRI <sub>5</sub>	Description	Chemical identity	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C23	C24	Mean	$\chi^2$	ANOVA	difMax-min	DF
<i>Average MF ≥ 50%</i>																	
931	721	Fruity	Propyl acetate	64	62	56	54	53	59	51	47	68	57	ns	ns	21	16
1074	805	Fruity, sweet, apple	Ethyl 2-methyl butyrate	69	46	55	65	48	68	70	75	75	63	ns	ns	28	4
1217	753	Like amylics	Amyl alcohols	69	76	75	65	66	65	72	58	65	68	ns	ns	18	128
1240	1186	Ripen fruit	<b>Ethyl hexanoate</b>	65	44	37	56	45	52	52	35	59	50	ns	ns	30	0
1294	983	Mushroom	1-Octen-3-one	63	43	32	48	72	47	53	70	72	55	**	**	40	32
1299	805	Smoked, toasted	<b>3-Methyl-2-butanol</b>	40	69	59	48	26	65	68	51	58	54	ns	ns	43	32
1383	887	Flowery, geranium	<i>trans</i> -3-Hexenol	75	74	76	69	73	71	68	72	80	73	ns	ns	12	128
1448		Vinegar, like fusel alcohols, ketchup	<b>Acetic acid</b>	53	40	65	56	61	56	74	56	65	58	ns	ns	33	0
1635	954	Rancid, varnish	$\gamma$ -Butyrolactone	75	80	61	77	77	76	81	72	67	74	ns	ns	20	16
1681		Cheese, rancid	2-Methyl butyric acid	84	73	76	77	79	83	76	79	77	78	ns	ns	11	128
1837	1267	Stewed fruit, flowery	2-Phenylethyl acetate	69	45	74	55	53	56	56	69	49	59	ns	ns	29	16
1860	1174	Fatty, stable	Hexanoic acid	70	71	76	66	67	76	73	73	83	73	ns	ns	16	16
1903	1071	Fruity, flowery, sweet	Benzyl alcohol	47	16	66	51	64	52	40	56	64	50	**	**	50	8
1929	1175	Roses	2-Phenyl ethanol	59	78	76	84	82	82	74	63	81	75	ns	ns	25	256
2047	1294	Sweet, spicy	4-Ethyl guaiacol	77	77	75	76	77	77	78	85	77	78	**	ns	10	256
2078	1358	Fatty, stable, spicy	Octanoic acid	78	58	62	65	59	81	78	73	63	69	**	**	23	128
2153		Leather, smoked	ni	79	40	47	43	67	41	47	47	76	54	**	**	39	16
2194	1165	Leather, stable	4-Ethyl phenol	70	76	65	57	76	65	77	69	62	68	ns	ns	20	256
2210	1095	Smoked, spicy, curry	Sotolon	65	85	61	77	46	55	81	85	72	70	**	ns	39	64
2285	1451	Fatty, stable	Decanoic acid	68	65	35	55	36	77	73	77	45	59	**	**	42	16
<i>Average MF &lt; 50%</i>																	
905	719	Fruity	<b>Ethyl propionate</b>	9	0	34	13	27	16	18	28	6	17	ns	ns	34	0
1057	804	Fruity	Ethyl butyrate	38	44	7	44	42	26	38	48	47	37	**	**	41	16
1093	818	Ripen fruit	Butyl acetate	31	44	0	27	13	0	0	6	0	14	**	**	44	0
1144	879	Fruity, banana	<b>Isoamyl acetate</b>	20	13	29	0	16	25	24	16	30	19	ns	ns	30	0
1364	889	Flowery, fruity	<b>Hexanol</b>	43	21	47	46	37	52	18	27	39	37	ns	ns	33	0
1404	867	Flowery, sweet	<i>cis</i> -3-Hexenol	49	9	7	30	0	36	29	53	0	24	**	**	53	0
1413		Vinegar, like fusel alcohols	ni	0	0	0	0	22	36	0	0	0	7	**	**	36	0
1419		Sweet, spicy	ni	0	0	7	0	0	0	0	0	65	8	**	**	65	0
1432	1016	Sweet, spicy, fruity	2-Octanol	29	6	0	9	34	0	0	29	0	12	**	**	34	0
1440	1190	Fruity, grass, resinous	Ethyl octanoate	52	60	17	63	6	40	29	27	24	35	**	**	57	32
1466	908	Dust, rancid, cooked vegetables	Methional	0	49	0	0	25	9	9	0	9	11	**	**	49	0
1486		Fruity, flowery, sweet	ni	0	0	0	0	47	6	34	16	20	14	**	**	47	0
1494	957	Fruity, flowery	Ethyl 3-hydroxybutyrate	36	25	21	18	27	38	36	29	33	29	ns	ns	20	8
1519	856	Fatty, stable	Propanoic acid	0	0	68	0	0	0	0	57	0	14	**	**	68	0
1529	909	Fatty, heavy	<i>iso</i> -Butyric acid	6	0	32	22	60	29	0	40	51	27	**	**	60	0
1554	1096	Fatty, resinous	1-Octanol	59	17	32	0	19	20	9	0	0	17	**	**	59	0
1567	966	Lactic, sharp, blue cheese	Butanoic acid	45	38	45	6	0	17	22	9	55	26	**	**	55	0
1653	1090	Flowery	Phenyl acetaldehyde	77	6	65	13	46	30	47	58	19	40	**	**	71	0
1735	1013	Cooked vegetables, sulfury	<b>Methionol</b>	38	60	42	57	16	59	34	48	43	44	ns	ns	44	64
1775		Flowery, fruity, coconut	ni	49	13	15	13	49	0	29	40	53	29	**	**	53	2
1801		Sweet flowery	Ethyl 4-hydroxybutyrate <sup>a</sup>	22	16	34	6	6	13	13	13	13	15	ns	ns	28	2
1880	1118	Smoked, sweet, spicy	<b>Guaiaicol</b>	37	39	39	40	38	40	9	25	43	35	ns	ns	34	8
1986		Flowery, spicy	ni	44	6	45	19	0	29	27	29	34	26	ns	ns	45	0
2001	1088	Smoked	<b>o-Cresol</b>	29	26	42	21	53	41	29	30	20	32	ns	ns	33	0
2100	1123	Leather, stable	<i>p</i> -Cresol	0	0	47	29	17	26	27	43	23	24	**	ns	47	0
2109	1099	Leather, stable	<i>m</i> -Cresol	40	30	24	47	10	23	18	0	28	25	**	ns	47	8
2171	1476	Spicy, sweet, leather	$\gamma$ -Decalactone	0	9	34	70	60	51	40	73	29	41	**	ns	73	0

Continued

## Aromas of cider...

Table 4—Continued.

LRI <sub>WAX</sub>	LRI <sub>5</sub>	Description	Chemical identity	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C23	C24	Mean	$\chi^2$	ANOVA	difMax-min	DF
2183	1385	Spicy, clover	Eugenol	70	76	54	0	41	65	0	0	62	41	**	**	76	0
2219		Smoked	ni	0	0	0	9	40	60	0	0	0	12	**	**	60	0
2246	1279	Smoked, spicy	4-Vinyl guaiacol	63	34	29	62	61	37	53	49	26	46	**	**	37	32
2261	1913	Resinous, dry grass	Ethyl hexadecanoate	0	0	0	0	0	36	6	34	38	13	**	**	38	0
2305		Flowery, vegetal	ni	0	0	0	0	33	6	18	9	36	11	**	**	36	0
2323		Balsamic, sweet	ni	6	0	0	0	0	0	31	27	40	12	**	**	40	16
2333		Stable, phenolic	ni	11	6	7	42	65	31	54	56	35	34	**	**	58	0
2360	1496	Spicy, phenolic	Isoeugenol	45	51	0	19	9	6	6	0	24	18	**	**	51	4

LRI<sub>WAX</sub>, LRI<sub>5</sub>: linear retention index on DB-WAX and DB-5 columns, respectively; ni: not identified; ns: not significant  
<sup>a</sup>significant at the 5% level.

Table 5—Pearson correlation coefficients between odor sensory attributes and olfactometric mean intensities or logarithm of volatile contents.

Odor attributes	I (%)	Log concentration
Vinegar	Butyl acetate (−0.706; <i>P</i> = 0.034)	–
	Amyl alcohols (−0.679; <i>P</i> = 0.044)	
	LRI 1413 (0.755; <i>P</i> = 0.019)	
	LRI 2219 (0.767; <i>P</i> = 0.016)	
	Isoeugenol (−0.739; <i>P</i> = 0.023)	
Fruity	<i>t</i> -3-hexenol (−0.677; <i>P</i> = 0.045)	Methionol (−0.831; <i>P</i> = 0.005)
	LRI 1486 (0.626; <i>P</i> = 0.071)	
Sweet	Methionol (−0.745; <i>P</i> = 0.021)	
	LRI 1486 (0.842; <i>P</i> = 0.004)	Methionol (−0.659; <i>P</i> = 0.053)
Spicy	Methionol (−0.761; <i>P</i> = 0.017)	
	4-EP (0.819; <i>P</i> = 0.007)	
	LRI 2305 (0.814; <i>P</i> = 0.008)	
	Amyl alcohols (−0.663; <i>P</i> = 0.051)	Methionol (−0.608; <i>P</i> = 0.082)
	LRI 1486 (0.767; <i>P</i> = 0.016)	
Lees	Methionol (−0.772; <i>P</i> = 0.015)	
	4-EP (0.837; <i>P</i> = 0.005)	
	Sotolon (−0.635; <i>P</i> = 0.066)	
	LRI 2305 (0.728; <i>P</i> = 0.026)	
	Ethyl 2-methylbutyrate (0.673; <i>P</i> = 0.047)	Octanoic acid (0.671; <i>P</i> = 0.048)
	2-Methylbutyric acid (0.642; <i>P</i> = 0.062)	Decanoic acid (0.602; <i>P</i> = 0.087)
	4-EP (−0.627; <i>P</i> = 0.071)	4-EG (−0.682; <i>P</i> = 0.043)
	4-VG (0.725; <i>P</i> = 0.027)	
	$\gamma$ -butyrolactone (−0.668; <i>P</i> = 0.049)	
	Ethyl hexadecanoate (0.634; <i>P</i> = 0.067)	

The role that some of these potentially active components may play in the interpretation of sensory perceptions can be evaluated through the correlations obtained between the mean scores of sensory attributes and the mean olfactometric intensities or the logarithm of volatile contents, as shown in Table 5.

Thus, the olfactometric intensities of 4-EP, amyl alcohols, *trans*-3-hexenol, 2-methylbutyric acid, methionol, and sotolon were significantly correlated with different odor sensory attributes. Other components such as butyl acetate or the nonidentified peaks (LRI 1413, 1486, and 2305) showed also significant correlations with sensory descriptors.

In agreement with their respective olfactometric assessments, the vinegar odor was negatively correlated with butyl acetate, and positively related to the nonidentified peak at 1413, described as vinegar (Table 4). The sensory attributes fruity, sweet, and spicy were positively correlated with the unknown peak at 1486 (de-

scribed as fruity, floral, and sweet), and negatively with methionol (Table 5). The powerful odorant 4-EP was directly associated with the sensory perceptions sweet and spicy, and inversely with the attribute lees.

The quantitative volatile composition analyzed gave less significant correlations with the sensory descriptors of ciders. It is worth to note that no relationship was found between the vinegar odor and the volatile acidity of the ciders. In fact, values for this parameter higher than 1.40 g acetic/L are common in Asturian Cider (Picinelli and others 2000) with no detrimental effect on its sensory quality. As reported elsewhere, acetic acid is more penetrating in thin ciders of low acidity than in full-bodied ones (Whiting 1973). Similarly, the odor detection for acetic acid in Ice wines is 3-fold that of table ones (Cliff and Pickering 2006), reinforcing the hypothesis of the masking effect of cider matrix. Likewise, methionol content was negatively correlated with the assessments of fruity, sweet, and spicy, while lees was directly associated to fatty acids and 4-VG, and inversely with 4-EG and  $\gamma$ -butyrolactone.

Unlike previous results on wine aroma (Escudero and others 2007), no correlations were found between fruity sensory notes and the contents of ethyl or acetate esters in cider, neither individually nor grouped (data not shown). Compared with wine aromatic composition, fatty acids and volatile phenols are predominant in cider, so that a strong masking effect should be expected. Also, many other cider components of cider such as polyphenols could contribute to decrease the volatility of those esters and subsequently, their sensory perception (Lorrain and others 2013).

## Conclusions

The quantitative analysis of these ciders has shown the presence of high amounts of fatty acids, alcohols, and volatile phenols as typical components of the aromatic profile of quality ciders. From the olfactometric study carried out, 55 components have been ranked by their intensities, 28 of them were found to be of greater importance to discriminate among samples. Components such as amyl alcohols, 2-phenylethanol, ethyl esters such as 2-methylbutyrate, hexanoate and octanoate, hexanoic and octanoic acids 2-phenylethyl acetate, 4-EG and 4-EP, were found to be common to other ciders, so that they could be considered as part of the aromatic structure of this beverage. Two volatile phenols (4-EG and 4-EP) were identified as powerful odorants, and were involved in the perception of the sensory attributes sweet, spicy, and lees.

## Acknowledgments

Financial support for this work was managed by the Natl. Inst. of Research and Agro-Food Technology (INIA) with ERDF and ESF funds (project RTA2009-00111). MJA thanks the INIA for a research grant. The authors are grateful to the staff of SERIDA

## Aromas of cider . . .

and to the Tasting Committee of the DOP “Cider from Asturias” for their unselfish participations in the olfactometric and sensory sessions, respectively.

## References

- AENOR. 1997. Recopilación de normas UNE, Análisis sensorial, Vol 1-Alimentación. Madrid: AENOR.
- Antonelli A, Castellari L, Zambonelli C, Carnacini A. 1999. Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem* 47:1139–44.
- Arias-Abrodo P, Margolles-Cabrales I, Mangas-Alonso JJ, Blanco-Gomis D. 2005. Fatty acid composition of cider obtained either by traditional or controlled fermentation. *Food Chem* 92:183–7.
- Blanco-Gomis D, Mangas-Alonso JJ, Margolles-Cabrales I, Arias Abrodo P. 2001. Gas chromatographic analysis of total fatty acids in ciders. *J Agric Food Chem* 49:1260–3.
- Blanco-Gomis D, Mangas-Alonso JJ, Margolles-Cabrales I, Arias-Abrodo P. 2002. Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles. *J Agric Food Chem* 50:1097–100.
- Buron N, Guichard H, Coton E, Ledauphin J, Barillier D. 2011a. Evidence of 4-ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders. *Food Chem* 125:542–8.
- Buron N, Coton M, Desmarais C, Ledauphin J, Guichard H, Barillier D, Coton E. 2011b. Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production activity. *Food Microbiol* 28:1243–51.
- Cliff MA, Pickering GJ. 2006. Determination of odour detection thresholds for acetic acid and ethyl acetate in Ice wine. *J Wine Res* 17:45–52.
- Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *J Agric Food Chem* 52:1653–60.
- Dravnieks A. 1985. Atlas of odor character profiles. In: ASTM Data Series DS 61, Philadelphia, Pa. p 1–2.
- Escudero A, Campo E, Fariña L, Cacho J, Ferreira V. 2007. Analytical characterization of the aroma of five Premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J Agric Food Chem* 55:4501–10.
- Ledauphin J, Guichard H, Saint-Clair J-F, Picoche B, Barillier D. 2003. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *J Agric Food Chem* 51:433–42.
- Lorrain B, Tempere S, Iturmendi N, Moine V, de Revel G, Teissedre P-L. 2013. Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: an insight at the molecular level. *Food Chem* 140:76–82.
- Mangas JJ, González MP, Blanco D. 1993. Influence of cider-making technology on low-boiling-point volatile compounds. *Z Lebensm Unters Forsch* 197:522–4.
- Mangas JJ, González MP, Rodríguez R, Blanco D. 1996. Solid-phase Extraction and determination of trace aroma and flavour components in cider by GC-MS. *Chromatographia* 42:101–4.
- Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Jourjon F, Prost, C. 2006. Characterization of odor-active volatiles in apples: influence of cultivars and maturity stage. *J Agric Food Chem* 54:2678–87.
- Picinelli A, Suárez B, Moreno J, Rodríguez R, Caso-García LM, Mangas JJ. 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *J Agric Food Chem* 48:3997–4002.
- Picinelli A, Suárez B, Fernández N, Rodríguez R, Fernández O. 2006. Calibration models for routine analysis of cider by mid-infrared spectroscopy. *LWT-Food Sci Technol* 39:1026–32.
- Rodríguez Madrera R, Palacios García N, García Hevia A, Suárez Valles B. 2005. Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor esters in cider. *J Chromatogr A* 1069:245–51.
- Rodríguez Madrera R, García Hevia A, Palacios García N, Suárez Valles B. 2008. Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. *LWT-Food Sci Technol* 41:2064–9.
- Satora P, Sroka P, Duda-Chodak A, Tarko T, Tuszyński T. 2008. The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples. *Food Chem* 111:513–9.
- Satora P, Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Tuszyński T, Czepielik M. 2009. Influence of prefermentative treatments and fermentation on the antioxidant and volatile profiles of apple wines. *J Agric Food Chem* 57:11209–17.
- Suárez Valles B, Pando Bedriñana R, Fernández Tascón N, González García A, Rodríguez Madrera R. 2005. Analytical differentiation of cider inoculated with yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juices. *LWT-Food Sci Technol* 38:455–61.
- Suárez Valles B, Pando Bedriñana R, González García A, Querol Simón A. 2007a. A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *J Appl Microbiol* 103:778–86.
- Suárez Valles B, Pando Bedriñana R, Fernández Tascón N, Querol Simón A, Rodríguez Madrera R. 2007b. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol* 24:25–31.
- Vidrih R, Hribar J. 1999. Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chem* 67:287–94.
- Villière A, Arvisenet G, Lethuaut L, Prost C, Sérot T. 2012. Selection of a representative extraction method for the analysis of odourant volatile composition of French cider by GC-MS-O and GC-TOF-MS. *Food Chem* 131:1561–8.
- Wang L, Xu Y, Zhao G, Li J. 2004. Rapid analysis of flavour volatiles in apple wine using headspace solid-phase microextraction. *J Inst Brew* 110:7–65.
- Whiting GC. 1973. Acetification in ciders and perries. *J Inst Brew* 79:218–26.
- Williams AA, May HV. 1981. Examination of an extract of cider volatiles using both electron impact and chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Inst Brew* 87:372–5.
- Williams AA, Tucknott OG. 1978. The volatile aroma components of fermented ciders: minor neutral components from the fermentation of sweet coppin apple juice. *J Sci Food Agric* 29:381–97.
- Xu Y, Fan, W, Qian MC. 2007. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavour evaporation and head-space solid-phase microextraction. *J Agric Food Chem* 55:3051–7.

**Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of  
cider\*\***

María José Antón, Belén Suárez Valles, Juan José Mangas Alonso, Ovidio Fernández García  
and Anna Picinelli-Lobo\*

Area of Food Technology, SERIDA, Carretera de Oviedo s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias,  
Spain

**Keywords:** cider, lees, volatile composition, olfactometric analysis

\*Corresponding author. TEL: +34 985 890066; FAX: +34 985 891854; e-mail:  
[apicinelli@serida.org](mailto:apicinelli@serida.org)

**\*\*Artículo en process de lectura en la revista Food Chemistry. Referencia:  
FOODCHEM-D-15-00334**

---

## 1 Abstract

2 The effect of different treatments involving contact with natural lees on the aromatic profile  
3 of cider has been evaluated. Comparing with the untreated ciders, the contact with lees  
4 brought about a significant increase of the concentrations of most of the volatile compounds  
5 analyzed, in particular fatty acids, alcohols, ethyl esters and 3-ethoxy-1-propanol. The  
6 opposite was observed among fusel acetate esters and 4-vinylguaiacol. The addition of  $\beta$ -  
7 glucanase enhanced the increase of ethyl octanoate, but produced a decrease in the contents  
8 of decanoic acid and all of the major volatiles excepting acetaldehyde, ethyl acetate and  
9 acetoin, whereas the application of oxygen influenced the rise of the level of 3-ethoxy-1-  
10 propanol only. The olfactometric profiles also revealed significant effects of the treatment  
11 with lees for ethyl propionate, diacetyl, *cis*-3-hexenol, acetic acid, benzyl alcohol, and *m*-  
12 cresol, while the addition of oxygen significantly influenced the perception of ethyl  
13 hexanoate, 1-octen-3-one, 3-methyl-2-butenol, *t*-3-hexenol and *c*-3-hexenol.

14

15

16

17



## 18 1. Introduction

19 Odour and flavour are the most important quality aspects of alcoholic beverages, paramount  
20 to determine the preferences of potential consumers. The development of these attributes  
21 throughout the making process is influenced by the succession of different and complex  
22 steps: selection of raw material, fermentation process and maturation or ageing.

23 Maturation and ageing are traditional oenological practices aiming at improving the  
24 organoleptic characteristics of wines. Sparkling and some types of white wines are usually  
25 left on their lees but nowadays, the ageing over-lees is gaining relevance also in the  
26 production of red wines in all viticultural areas (Fornairon-Bonnedond, Camarasa, Moutounet  
27 & Salmon, 2002; Pérez- Serradilla & Luque de Castro, 2008).

28 The composition of lees is highly variable as they are mainly formed by  
29 microorganisms (yeasts and bacteria) and their autolysis products, together with organic and  
30 inorganic residues coming from the must. The autolysis of yeasts provides the must with  
31 valuable macromolecular components which play important roles in colloidal stability  
32 phenomena, stimulation of malolactic fermentation and sensory improving of wines  
33 (Fornairon-Bonnedond *et al.*, 2002). Besides, lees are able to retain undesirable components  
34 such as sulfurs and volatile phenols (Chassagne, Guilloux-Benatier, Alexandre & Voilley,  
35 2005; Pradelles, Alexandre, Ortiz-Julien & Chassagen, 2008; Vasserot, Steinmetz & Jeandet  
36 2003), reinforcing existing evidences of the ability of lees to modify wine organoleptic  
37 characteristics.

38 Regarding aroma, the influence of a short contact with lees on the aromatic  
39 composition of wines is controversial. Bautista, Fernández, and Falqué (2007) observed a  
40 generalised significant increase of the volatile compounds of wines after contact with lees,

41 while others (Loscos, Hernández-Orte, Cacho & Ferreira, 2009) found the opposite effect. In  
42 the particular case of sparkling wine, there are typical profiles of volatile compounds related  
43 to ageing time (Francioli, Torrens, Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas, 2003;  
44 Torrens, Riu-Aumatell, Vichi, López-Tamames & Buxaderas, 2010). Ageing time has been  
45 identified as the main responsible for changes in the aromatic composition of sparkling ciders  
46 (Rodríguez Madrera, García Hevia, Palacios García & Suárez Valles, 2008).

47 Cider is a worldwide popular drink which consumption figures have been increasing  
48 in the last years. Asturias, with making rates close to 80M litres, is the fifth European  
49 producer ([www.aicv.org](http://www.aicv.org)). In this region, traditional cider is made by spontaneous  
50 fermentation (alcoholic and malolactic) of apple musts, followed by an optional step of  
51 maturation over-lees, which is claimed to bring about positive sensory characteristics, such as  
52 improved foaming properties and aroma complexity. Because of the cider-making process,  
53 lees are expected to be complex, since they include the presence of lactic bacteria.

54 The management of lees in winemaking has been the focus of many studies. Those  
55 reports include the application of microoxygenation to reduce sulphur off-odours or to  
56 improve wine colour and stability (Gómez-Plaza & Cano-López, 2011), and the use of  
57 enzymes to either accelerate the autolysis process or enhance the aromatic potential of wines  
58 (Masino, Montecocchi, Arfelli & Antonelli, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2005; Rocha,  
59 Coutinho, Delgadillo, dias Cardoso & Coimbra, 2005; Sánchez Palomo, Díaz-Maroto,  
60 González-Viñas & Pérez-Coello 2005; Torresi, Frangipane & Anelli, 2011). However, to the  
61 best of our knowledge, these studies have not been made before in cider. Therefore, the  
62 purpose of this paper is to evaluate the effect of different treatments based on the contact with  
63 fermentation lees on the volatile composition and the olfactometric profiles of cider.

## 64 **2. Materials and methods**

## 65 2.1 Reagents and Standards

66 The volatile standards were supplied by Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (Gillingham, U.K.),  
67 and Flucka (Buchs, Switzerland). Pentane (Merck, Darmstadt, Germany), dichlorometane,  
68 absolute ethanol, ammonium sulphate and anhydrous sodium sulphate were from Panreac  
69 (Barcelona, Spain). All the reagents were of chromatographic quality. A  $\beta$ -glucanase  
70 commercial preparation (Enovin Glucan) was purchased from Agrovin (León, Spain).

## 71 2.2 Micro-Oxygenation equipment

72 A multiple diffuser micro-oxygenation DosiOx equipment provided by Agrovin (León,  
73 Spain) was used. The oxygen employed was Ultrapure Plus from Carbuos Metálicos  
74 (Barcelona, Spain).

## 75 2.3 Experimental design

76 A thousand litres of clean racked cider were obtained from a local cellar, and distributed  
77 between 100L-stainless steel tanks. This cider was made according to the usual procedure  
78 that is, pressing of a mixture of cider apples, spontaneous clarification and alcoholic and  
79 malolactic fermentation. The lees coming from the fermentation of this cider were also  
80 sampled, homogenized and used without further handling. Two tanks containing cider  
81 without treatment were taken as controls, and the other eight batches were added with lees  
82 (5% v/v) and different combinations of enzyme ( $\beta$ -glucanase, 5 g/hL) and oxygen  
83 (6mL/L/month), as shown in Figure 1. The experiment lasted two months at 12° C, and after  
84 that, the ciders were sampled and analysed.

## 85 2.4 Analysis of major volatile compounds

86 Major volatiles were analysed by direct injection by GC-FID, as described elsewhere (Suárez  
87 Valles, Pando Bedriñana, Fernández Tascón, González García & Rodríguez Madrera, 2005).

## 88 2.5 Analysis of minor volatile compounds

89 Minor volatiles were analysed by GC-FID, after a one-step liquid-liquid extraction, as  
90 described elsewhere (Antón, Suárez Valles, García Hevia & Picinelli Lobo, 2014).

## 91 2.6 Olfactometric analysis

92 Olfactometric analyses were done by means of a Hewlett-Packard 5890 model fitted  
93 with a flame ionization detector, coupled to an Olfactory Port 275 at 220° C (Ingeniería  
94 Analítica, S.L., Barcelona, Spain), and a DB-WAX column (30 m x 0.32 mm; 0.50 µm from  
95 J&W Folson, CA, USA). The odorants were also injected on a DB-5 column (30m x  
96 0.32mm; 0.25 µm from J&W Folson, CA, USA) for identification purposes. A panel of 6-8  
97 people carried out the sniffings of the aforementioned cider extracts according to the  
98 methodology optimized by Antón et al. (2014).

## 99 2.7 Statistical analysis

100 A multivariate two-way analysis of variance was carried out to assess the influence of  
101 oxygen and enzyme on the chemical composition of ciders and GC/O profiles by means of  
102 the SPSS v.12.0 for Windows.

103 Subsequently, an (ANOVA)-Simultaneous Component Analysis (ASCA) was  
104 performed to model the influence of the variation sources (application of microoxygenation  
105 and/or enzyme) on the chemical and olfactometric profiles of ciders by applying the  
106 following generalized model:

$$107 \quad X_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

108 where  $X_{ijk}$  is the value of any variable (chemical or olfactometric) for the cider  $k$  with  $i$  and  $j$   
109 levels for A (oxygen) and B (enzyme) factors, respectively;  $\mu$  is the general mean value;  $A_i$  is  
110 the contribution of factor A at level  $i$ ;  $B_j$  is the contribution of factor B, at level  $j$ ;  $AB_{ij}$   
111 represents the interaction between the factors A and B at levels  $i$  and  $j$ , and  $\varepsilon_{ijk}$  is the variation  
112 captured in the term error. In our case, the nomenclature used to name means of treatments  
113 was as follows:  $X_{A1}$ : oxygen;  $X_{A2}$ : no-oxygen;  $X_{B1}$ : enzyme;  $X_{B2}$ : no-enzyme. Four matrices  
114 were constructed: one for each factor, the interaction and error matrices, and PCA was  
115 subsequently applied on each one. The statistical program used was Unscrambler 9.2.

### 116 **3. Results and discussion**

#### 117 3.1 Quantitative volatile component analyses

118 The ciders were analysed in duplicate for volatile composition, and data were  
119 statistically evaluated, the factors being the addition of lees only, or lees combined with  
120 oxygen and/or enzyme.

121 Regarding major volatiles and compared with the control ciders, the contact with lees  
122 brought about a significant decrease of the contents of *iso*-butanol, amyl alcohols, and  
123 acetoin, and the increase of those of 1-propanol. Among the minor components, only seven  
124 components were not influenced by the contact with lees: decanoic acid, 4-ethylguaiacol (4-  
125 EG), *cis*-3-hexenol, ethyl 3-hydroxybutyrate and ethyl 4-hydroxybutyrate,  $\gamma$ -butyrolactone,  
126 and methionol. The general effect was the increase of the concentrations, those of 3-ethoxy-  
127 1-propanol, 4-ethylcatechol (4-EC), ethyl octanoate and octanoic acid being the most  
128 noticeable. Conversely, the contact with lees gave a significant decrease in the concentrations  
129 of the fusel acetate esters and 4-vinylguaiacol (4-VG) (Table 1). The levels of volatile  
130 phenols found in these ciders ranged between a hundred  $\mu\text{g/L}$  and 18  $\text{mg/L}$ , which are similar

131 to those described for French ciders (Buron, et al., 2011b). Some studies reported the  
132 influence of the yeast strains on the sorption of volatile phenols by lees (Chassagne et al.,  
133 2005; Pradelles et al., 2008), while others show significant increases of these components as  
134 a consequence of the contact with wine lees (Masino et al., 2008). In our case, the increase in  
135 the contents of 4-EP and 4-EC in the ciders with lees could be related to the presence of  
136 different strains of *Lactobacillus collinoides* lactic acid bacteria (data not shown), which are  
137 able to synthesize large amounts of those compounds from hydroxycinnamic acids,  
138 particularly 4-EC (Beech & Carr, 1977; Buron, Guichard, Coton, Ledauphin & Barillier,  
139 2011a).

140 The effect of the application of microoxygenation or enzyme on the aromatic  
141 composition of treated ciders is summarised in Table 2. As seen, the presence of oxygen  
142 influenced the content of 3-ethoxy-1-propanol only, while the addition of enzyme did affect  
143 the concentrations of decanoic acid, ethyl octanoate and all of the major volatiles excepting  
144 acetaldehyde and ethyl acetate. Contents of methanol and fusel alcohols decreased in the  
145 ciders submitted to enzymatic treatment. As reported in previous works, the effect of  
146 treatments of wines with lees alone or together with  $\beta$ -glucanase and/or microoxygenation is  
147 not straightforward (Bautista *et al.*, 2007; Bueno, Peinado, Medina & Moreno, 2006;  
148 Hernández-Orte, et al., 2009; Masino et al., 2008; Rodríguez-Bencomo, Ortega-Heras &  
149 Pérez-Magariño, 2010). This variability was explained on the basis of many factors: grape  
150 varieties (Bueno et al., 2006; Ortega-Heras, Rovero-Pérez, Pérez-Magariño, González-Huerta  
151 & González-Sanjosé, 2008), nature and characteristics of lees or the time of contact with  
152 them (Bautista et al., 2007; Gallardo-Chacón, Vichi, López-Tamames & Buxaderas, 2010).

153 Among the minor volatiles, the addition of  $\beta$ -glucanase had a negative effect on  
154 decanoic acid contents, while the application of microoxygenation produced the rise of 3-

155 ethoxy-1-propanol concentration. Within the group of volatile phenols, the presence of  
156 oxygen increased the contents of 4-EC only, although a significant interaction between  
157 factors was observed. As said before, different strains of *Lactobacillus collinoides* should be  
158 associated to the synthesis of 4-EC; these microorganisms are microaerophilic and therefore,  
159 their activity should be favoured by the presence of tiny amounts of oxygen (Table 2).

160 An ANOVA-Simultaneous Component analysis (ASCA) was used to reinforce the  
161 conclusions from multivariate variance analysis. This approach is useful when many  
162 variables are taken into account with only a few observations (Jansen, Hoefsloot, van der  
163 Greef, Timmerman, Westerhuis & Smilde, 2005). In this study, ASCA gave four vectors:  
164  $X_{A1}$ ,  $X_{A2}$  (average of treatment with or without oxygen),  $X_{B1}$ ,  $X_{B2}$  (average of treatments with  
165 or without enzyme), which were projected onto the only principal component computed.  $X_{A1}$   
166 and  $X_{B2}$  vectors had positive loadings, while the opposite was detected for  $X_{A2}$  and  $X_{B1}$ . Five  
167 chemical variables gave the most significant loadings onto this principal component. On the  
168 one hand, 4-EC was strongly associated with the treatments with oxygen (loading = 0.97),  
169 whereas the opposite was observed for 4-VG (loading = -0.06). On the other hand, the  
170 content of ethyl octanoate was correlated to the treatments with enzyme (loading = -0.50)  
171 while the production of octanoic (loading= 0.35) and decanoic acids (loading= 0.75) was  
172 higher without enzyme added. Lactic acid bacteria can profit the products released from the  
173 autolysis of yeasts to synthesize ethyl esters (Sumbly, Grbin & Jiranek, 2010), as well as  
174 many other volatile components, such as fatty acids, alcohols, methionol, and  $\gamma$ -  
175 butyrolactone, this activity being strain-dependent (Pozo-Bayón et al., 2005; Ugliano &  
176 Moio, 2005).

177 In general terms, the results obtained from ASCA were complementary with those  
178 from MANOVA so as to ascertain the effect of the application of oxygen or enzyme on the

179 chemical profiles of ciders and the olfactometric perception of different components, where  
180 the MANOVA approach did not show significant differences for these factors. This was the  
181 case for octanoic acid, which contents were found to be higher in ciders without enzyme.

### 182 3.2 Olfactometric volatile analyses

183 Comparing with the control ciders, the contact with lees significantly increased the  
184 intensities of ethyl propionate, acetic acid, two alcohols (*c*-3-hexenol and benzyl alcohol),  
185 and *m*-cresol, and decreased that of diacetyl; this fact may be related to the synthesis of 2,3-  
186 butanediol by lactic bacteria (Swiegers, Bartowsky, Henschke & Pretorius, 2005).

187 The effect of the subsequent applications of microoxygenation or enzyme on the  
188 olfactometric profile of ciders are summarised in Table 3. Two groups of odorants have been  
189 established on the basis of the average of their mean values for mean frequencies (MF).

190 In the first group were included those volatiles exhibiting a MF  $\geq$  50% in at least one  
191 of the treatments. In this category there were components clearly perceived in all the samples,  
192 including fusel alcohols (amylics and 2-phenylethanol), being major contributors to the  
193 aroma of cider from the quantitative point of view, or not quantifiable components, such as  
194 sotolon. In the second group, twenty-nine odorants were included. From the qualitative point  
195 of view, almost all of these components have been described in Chinese and French ciders  
196 (Xu, Fan & Qian, 2007; Villière, Arvisenet, Lethuaut, Prost & Serot, 2012). Comparing with  
197 a previous report on Spanish ciders (Antón et al., 2014), different components have been  
198 found: diacetyl, acetoin, two sweet-like odorants (V55, V56), and one compound described  
199 as cooked vegetables (V9).

200 The influence of the application of microoxygenation and/or enzyme has been  
201 evaluated by a multivariate analysis of variance. As shown in Table 3, the presence of oxygen



202 increased the odour intensity of ethyl hexanoate and alcohols (3-methyl-2-butenol, *t*-3-  
203 hexenol), and decreased those of 4-EG, 1-octen-3-one, and *cis*-3-hexenol. On the contrary,  
204 the addition of the enzyme gave a significant decrease of the perception of 3-methyl-2-  
205 butenol and the odorant referred to as V76. No significant interactions were found between  
206 these technological factors excepting for butyl acetate, ethyl 2-methylbutyrate ( $p < 0.001$ ), and  
207 isoeugenol ( $p < 0.05$ ).

208         Figures 2 and 3 show the projection of the olfactometric variables studied onto the  
209 principal component computed for oxygen and enzyme factors. As can be seen, ethyl 2-  
210 methylbutyrate (V5), 3-methyl-2-butenol (V13) and a sweet odorant (V55) were the most  
211 correlated with oxygen, while butyl acetate (V6), 4-EG (V52), *cis*-3-hexenol (V17), *iso*-  
212 butyric acid (V30), 1-octen-3-one (V12) and ethyl propionate (V1) were better correlated  
213 with the absence of oxygen (Figure 2). On the other hand, one peak described as phenolic,  
214 stable (V76), 3-methyl-2-butenol (V13), and *m*-cresol (V58) were associated with the  
215 absence of enzyme, while butyl acetate (V6), diacetyl (V3), and another sweet odorant (V56)  
216 were linked to the enzyme treatments (Figure 3).

217         Among the olfactometric components, *iso*-butyric acid, ethyl propionate, *m*-cresol and  
218 the odorants referred to as V56 and V76 were also related to the factors evaluated. Moreover,  
219 the analysis of these data by ASCA allowed to ascertain that both enzyme and  
220 microoxygenation significantly increased the perception of butyl acetate and ethyl 2-  
221 methylbutyrate.

#### 222 **4. Conclusions**

223         The contact with lees brought about significant changes in the volatile composition of cider  
224 as evidenced the general increase in the contents of almost all of the minor volatile

225 compounds. From the technological point of view, the addition of  $\beta$ -glucanase and/or  
226 microoxygenation may benefit the aromatic potential of cider, taking into account the effect  
227 of these factors on the perception of ethyl hexanoate, 4-EG, butyl acetate and ethyl 2-  
228 methylbutyrate. However, more research is needed to evaluate the convenience and  
229 consequences of the application of such treatments or their combinations.

### 230 **Acknowledgments**

231 Financial support for this work was managed by the National Institute of Research and Agro-  
232 Food Technology (INIA) with ERDF and ESF funds (projects RTA2009-00111). MJA thanks  
233 the INIA for a research grant. The authors are also grateful the staff of SERIDA for their  
234 unselfish participations in the olfactometric sessions.

235

236

237

238

### 239 **References**

240 Antón, M.J., Suárez Valles, B., García Hevia, A. & Picinelli Lobo, A. (2014). Aromatic  
241 profile of ciders by chemical quantitative, gas chromatography-olfactometry and sensory  
242 analysis. *Journal of Food Science* 79, S92-S99.

243

244 Bautista, R., Fernández, E. & Falqué, E. (2007). Effect of the contact with fermentation-lees  
245 or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *European Food Research &*  
246 *Technology* 224, 405-413.

247

248 Beech, F.W. & Carr, J.G. (1977). Cider and Perry. In A.H. Rose (Ed.), *Economic*  
249 *Microbiology Vol.1*, (pp 139-293), London: Academic Press.

250

251 Bueno, J.E., Peinado, R.A., Medina, M. & Moreno, J. (2006). Effect of a short contact time  
252 with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnology Letters* 28,  
253 1007-1011.

254

255 Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D. & Coton, E.  
256 (2011b). Screening of representative cider yeast and bacteria for volatile phenol-production  
257 ability. *Food Microbiology* 28, 1243-1251.

258

259 Buron, N., Guichard, H., Coton, E., Ledauphin, J. & Barillier, D. (2011a). Evidence of 4-  
260 ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders. *Food*  
261 *Chemistry* 125, 542-548.

262

263 Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. & Voilley, A. (2005). Sorption of wine  
264 volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry* 91, 39-44.

265

266 Fornairon-Bonnedond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., & Salmon, J.M. (2002). New trends  
267 on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *Journal International des*  
268 *Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 49-69.

269

270 Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2003).  
271 Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of*  
272 *Enology and Viticulture* 54, 158-162.

273

274 Gallardo-Chacón, J.J., Vichi, S., López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2010). Changes in the  
275 sorption of diverse volatiles by *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing.  
276 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12426-12430.

277

278 Gómez-Plaza, E. & Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines:  
279 Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry* 125, 1131-1140.

280

281 Hernández-Orte, P., Lapeña, A.C., Escudero, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L.,  
282 Ferrer, S., Cacho, J., Ferreira, V. (2009). Effect of micro-oxygenation on the evolution of  
283 aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood. *LWT-Food*  
284 *Science and Tehcnology* 42, 391-401.

285

286 Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., van der Greef, J., Timmerman, M.E., Westerhuis, J.A. &  
287 Smilde, A.K. (2005). ASCA: analysis of multivariate data obtained from an experimental  
288 design. *Journal of Chemometrics* 198, 469-481.

289

290 Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2009). Fate of grape flavour  
291 precursors during storage on yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57,  
292 5468-5479.

293

294 Masino, F., Montecocchi, G., Arfelli, G. & Antonelli, A. (2008). Evaluation of the combined  
295 effects of enzymatic treatment and ageing on lees on the aroma of wine from *Bombino bianco*  
296 grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9495-9501.

297

298 Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology:  
299 current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 265-  
300 286.

301

302 Ortega-Heras, M., Rivero-Pérez, M.D., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González-  
303 Sanjosé, M.L. (2008). Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak  
304 barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation. *European*  
305 *Food Research & Technology* 226, 1485-1493.

306

307 Pérez Serradilla, J.A. & Luque de Castro, M.D. (2008). Role of lees in wine production: A  
308 review. *Food Chemistry* 111, 447-456.

309

310 Pozo-Bayón, M.A., G-Alegría, E., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P.J., Calvo de la  
311 Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F. & Moreno-Arribas, M.V. (2005). Wine volatile and amino acid  
312 composition alter malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus*  
313 *plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8729-8735.

314

315 Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A. & Chassagne, D. (2008). Effects of yeast cell-  
316 wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity on model wine. *Journal of*  
317 *Agricultural and Food Chemistry* 56, 11854-11861.

318

319 Rocha, S.M., Coutinho, P., Delgadillo, I., Dias Cardoso, A. & Coimbra, M.A. (2005). Effect  
320 of enzymatic aroma release on the volatile compounds of white wines presenting different  
321 aroma potentials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 199-205.

322

323 Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M. & Pérez-Magariño, S. (2010). Effect of  
324 alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic  
325 fermentation on the aromatic composition of red wine. *European Food Research &*  
326 *Technology* 230, 485-496.

327

328 Rodríguez Madrera, R., García Hevia, A., Palacios García, N. & Suárez Valles, B. (2008).  
329 Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. *Lebensmittel-Wissenschaft und*  
330 *Technologie 41*, 2064-2069.

331

332 Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto Hidalgo, M.C., González-Viñas, M.A. & Pérez-Coello,  
333 M.S. (2005). Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous  
334 glycosidases. *Food Chemistry 92*, 627-635.

335

336 Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernández Tascón, N., González García, A., &  
337 Rodríguez Madrera, R. (2005). Analytical differentiation of cider inoculated with yeasts  
338 (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juices. *Lebensmittel-*  
339 *Wissenschaft und Technologie 38*, 455-461.

340

341 Sumbly, K.M., Grbin, P.R. & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in  
342 wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry 121*, 1-16.

343

344 Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial  
345 modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research 11*,  
346 139-145.

347

348 Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2010).  
349 Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *Journal of*  
350 *Agricultural and Food Chemistry* 58, 2455-2461.

351

352 Torresi, S., Frangipane, M.T. & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine  
353 production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry* 129,  
354 1232-1241.

355

356 Ugliano, M. & Moio, L. (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile  
357 compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures  
358 of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10134-10139.

359

360 Vasserot, Y., Steinmetz, V. & Jeandet, P. (2003). Study of thiol consumption by yeast lees.  
361 *Antonie van Leeuwenhoek*. 83, 201-207.

362

363 Villière, A., Arvisenet, G., Lethuaut, L., Prost, C. & Serot, T. (2012). Selection of a  
364 representative extraction method for the analysis of odourant volatile composition of French  
365 cider by GC-MS-O and GC-TOF-MS. *Food Chemistry* 131, 1561-1568.

366



- 367 Xu, Y., Fan, W. & Qian, M.C. (2007). Characterization of aroma compounds in apple cider  
368 using Solvent-Assisted Flavour Evaporation and Headspace Solid-Phase Microextraction.  
369 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3051-3057.

**Table 1** Effect of the contact with lees on the quantitative volatile composition (mean of treatments  $\pm$  sd) of ciders

	Sig	Control	Lees
<b>Major volatiles (mg/L)</b>			
Acetaldehyde	ns	10 $\pm$ 4	9 $\pm$ 3
Ethyl acetate	ns	41 $\pm$ 2	40 $\pm$ 3
Methanol	ns	50 $\pm$ 2	47 $\pm$ 5
1-Propanol	***	10 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2
<i>iso</i> -Butanol	*	33 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3
1-Butanol	ns	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
Amyl alcohols	*	233 $\pm$ 8	218 $\pm$ 18
Acetoin	***	35 $\pm$ 6	22 $\pm$ 6
Ethyl lactate	ns	56 $\pm$ 8	56 $\pm$ 6
2-Phenyl ethanol	ns	150 $\pm$ 5	146 $\pm$ 11
<b>Minor volatiles (<math>\mu</math>g/L)</b>			
<i>Fatty acids</i>			
Hexanoic	***	3,198 $\pm$ 488	4,232 $\pm$ 339
Octanoic	***	5,663 $\pm$ 669	13,543 $\pm$ 2,724
Decanoic	ns	2,268 $\pm$ 663	2,400 $\pm$ 1,124
<i>Volatile phenols</i>			
4-Ethylguaiacol	ns	110 $\pm$ 75	159 $\pm$ 29
4-Ethylphenol	***	1,735 $\pm$ 268	3,036 $\pm$ 178
4-Vinylguaiacol	***	3,173 $\pm$ 458	1,832 $\pm$ 360
4-Ethylcatechol	***	3,332 $\pm$ 1,040	14,002 $\pm$ 3,099
<i>Alcohols</i>			
3-Methyl-3-butenol	***	21 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2
1-Pentanol	***	55 $\pm$ 13	70 $\pm$ 6
3-Methyl-2-butenol	***	17 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4
3-Methyl-1-pentanol	*	74 $\pm$ 12	82 $\pm$ 5

Table 1 Continued

	Sig	Control	Lees
Hexanol	***	3,741 ± 607	4,482 ± 296
<i>trans</i> -3-hexenol	**	32 ± 4	36 ± 3
<i>cis</i> -3-hexenol	ns	450 ± 84	499 ± 34
Benzylic	***	94 ± 21	179 ± 34
<b><i>Ethyl esters</i></b>			
2-Methylbutyrate	**	17 ± 6	26 ± 4
Hexanoate	***	221 ± 41	317 ± 44
Octanoate	***	510 ± 103	1,841 ± 459
3-Hydroxybutyrate	ns	47 ± 9	51 ± 6
4-Hydroxybutyrate	ns	725 ± 150	710 ± 126
<b><i>Acetate esters</i></b>			
Isoamyl	***	455 ± 96	333 ± 43
2-Phenylethyl	***	267 ± 75	102 ± 15
<b><i>Others</i></b>			
3-Ethoxy-1-propanol	***	70 ± 18	577 ± 169
$\gamma$ -Butyrolactone	ns	659 ± 118	699 ± 171
Methionol	ns	514 ± 89	449 ± 73

Sig: significance; ns: not significant; (\*) significant at 10% level; (\*\*) significant at 5% level; (\*\*\*) significant at 1% level

**Table 2** Effect of the application of oxygen and/or enzyme on the quantitative volatile composition (mean of treatments  $\pm$  sd) of ciders

	Sig			Ox	no-Ox	Enz	no-Enz
	Int	Ox	Enz				
<b>Major volatiles (mg/L)</b>							
Acetaldehyde	ns	ns	ns	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 5	11 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3
Ethyl acetate	ns	ns	ns	39 $\pm$ 6	38 $\pm$ 3	37 $\pm$ 5	39 $\pm$ 4
Methanol	ns	ns	***	43 $\pm$ 7	45 $\pm$ 5	42 $\pm$ 5	47 $\pm$ 6
1-Propanol	ns	ns	***	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2
<i>iso</i> -Butanol	ns	ns	**	29 $\pm$ 4	30 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3
1-Butanol	ns	ns	**	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0
Amyl alcohols	ns	ns	***	205 $\pm$ 29	209 $\pm$ 19	196 $\pm$ 24	218 $\pm$ 20
Acetoine	**	ns	**	32 $\pm$ 11	37 $\pm$ 25	42 $\pm$ 23	27 $\pm$ 9
Ethyl lactate	**	ns	**	57 $\pm$ 22	56 $\pm$ 5	51 $\pm$ 7	62 $\pm$ 19
2-Phenyl ethanol	ns	ns	**	137 $\pm$ 18	139 $\pm$ 12	130 $\pm$ 14	146 $\pm$ 12
<b>Minor volatiles (<math>\mu</math>g/L)</b>							
<b><i>Fatty acids</i></b>							
Hexanoic	ns	ns	ns	4,375 $\pm$ 654	3,906 $\pm$ 435	4,066 $\pm$ 731	4,215 $\pm$ 433
Octanoic	ns	ns	ns	13,227 $\pm$ 2,735	12,128 $\pm$ 2,497	12,361 $\pm$ 3,103	13,124 $\pm$ 2,064
Decanoic	ns	ns	**	2,148 $\pm$ 452	1,988 $\pm$ 922	1,757 $\pm$ 400	2,378 $\pm$ 839
<b><i>Volatile phenols</i></b>							
4-Ethylguaiacol	ns	ns	ns	121 $\pm$ 30	123 $\pm$ 45	111 $\pm$ 33	133 $\pm$ 39
4-Ethylphenol	ns	ns	ns	2,985 $\pm$ 440	2,772 $\pm$ 335	2,812 $\pm$ 465	2,945 $\pm$ 324
4-Vinylguaiacol	ns	ns	ns	1,586 $\pm$ 322	1,716 $\pm$ 371	1,557 $\pm$ 339	1,745 $\pm$ 342
4-Ethylcatechol	*	***	ns	18,159 $\pm$ 3,474	12,652 $\pm$ 2,630	15,126 $\pm$ 4875	15,684 $\pm$ 3351
<b><i>Alcohols</i></b>							
3-Methyl-3-butenol	***	ns	ns	28 $\pm$ 4	24 $\pm$ 4	25 $\pm$ 6	37 $\pm$ 3
1-Pentanol	**	ns	ns	70 $\pm$ 10	62 $\pm$ 10	63 $\pm$ 12	69 $\pm$ 8
3-Methyl-2-butenol	**	ns	ns	29 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5	26 $\pm$ 6	28 $\pm$ 3

Table 2 Continued

	Sig			Ox	no-Ox	Enz	no-Enz
	Int	Ox	Enz				
3-Methyl-1-pentanol	**	ns	ns	88 ± 12	75 ± 11	79 ± 17	84 ± 7
Hexanol	**	ns	ns	4,412 ± 629	4,041 ± 580	4,107 ± 740	4,347 ± 475
<i>trans</i> -3-hexenol	**	ns	ns	36 ± 6	32 ± 5	33 ± 7	35 ± 4
<i>cis</i> -3-hexenol	ns	ns	ns	518 ± 78	452 ± 66	473 ± 98	497 ± 52
Benzylic	**	ns	ns	168 ± 28	149 ± 39	147 ± 38	171 ± 27
<b><i>Ethyl esters</i></b>							
2-Methylbutyrate	ns	ns	ns	24 ± 7	25 ± 3	25 ± 7	24 ± 4
Hexanoate	ns	ns	ns	315 ± 90	314 ± 40	334 ± 85	296 ± 42
Octanoate	ns	ns	**	1,922 ± 995	2,069 ± 640	2,343 ± 979	1,647 ± 442
3-Hydroxybutyrate	ns	ns	ns	56 ± 8	46 ± 7	50 ± 11	52 ± 6
4-Hydroxybutyrate	**	**	ns	878 ± 147	628 ± 127	733 ± 226	773 ± 137
<b><i>Acetate esters</i></b>							
Isoamyl	ns	ns	ns	312 ± 62	315 ± 62	318 ± 73	310 ± 49
2-Phenylethyl	ns	ns	ns	96 ± 29	94 ± 14	97 ± 27	93 ± 17
<b><i>Others</i></b>							
3-Ethoxy-1-propanol	ns	***	ns	1,005 ± 134	515 ± 184	731 ± 337	788 ± 255
$\gamma$ -Butyrolactone	**	**	ns	955 ± 151	607 ± 165	762 ± 283	801 ± 183
Methionol	**	**	ns	536 ± 89	399 ± 77	450 ± 128	484 ± 83

Sig: significance; ns: not significant; (\*) significant at 10% level; (\*\*) significant at 5% level; (\*\*\*) significant at 1% level

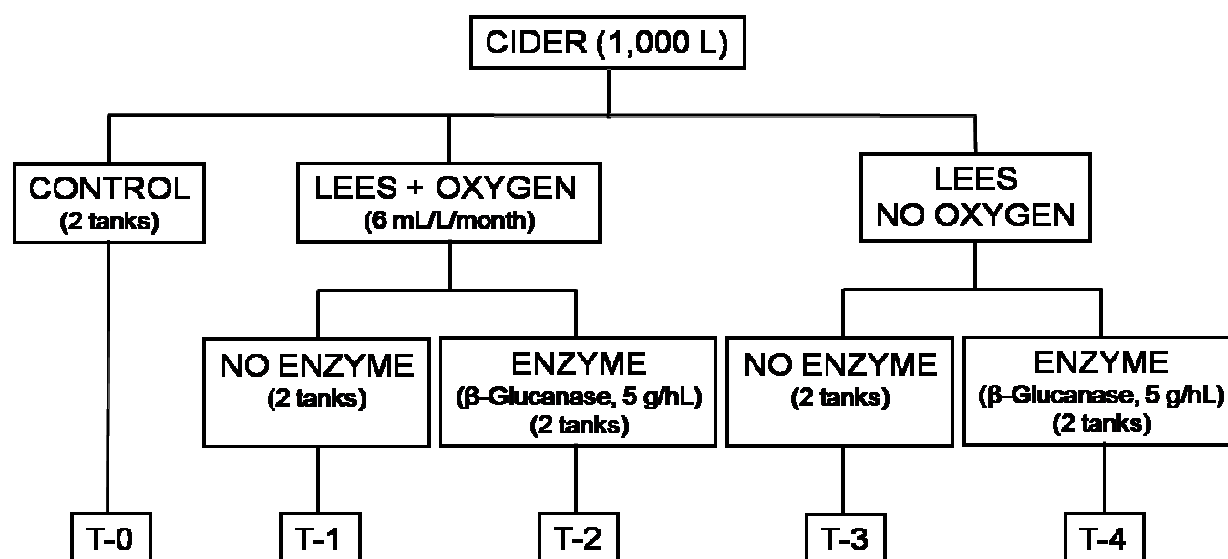
**Table 3** Influence of the presence of oxygen and enzyme on the olfactometric profiles of ciders

LRI <sub>WAX</sub>	LRI <sub>5</sub>	Description	Identity	RefV	Sig			Ox	no-Ox	Enz	No-Enz
					Int	Ox	Enz				
<i>Average MF ≥ 50%</i>											
1093	818	Ripen fruit	Butyl acetate	V6	***	***	***	63	57	65	55
1217	753	Like fusel alcohols	Amyl alcohols	V8	ns	ns	ns	58	65	58	66
1240	1186	Rippen fruit	Ethyl hexanoate	V10	ns	*	ns	60	44	59	46
1294	983	Mushroom	1-Octen-3-one	V12	ns	*	ns	34	51	44	42
1299	805	Smoked, toasted	3-Methyl-2-butenol	V13	ns	***	**	74	40	52	63
1383	887	Flowery, geranium	<i>l</i> -3-Hexenol	V16	ns	*	ns	69	50	61	58
1448		Vinegar, like fusel alcohols	Acetic acid	V22	ns	ns	ns	63	52	58	58
1466		Dust, rancid, cooked vegetables	Methional	V23	ns	ns	ns	51	48	47	51
1635	954	Rancid, varnish	$\gamma$ -Butyrolactone	V34	ns	ns	ns	79	71	77	73
1681		Cheese, rancid	2-Methylbutyric acid	V36	ns	ns	ns	75	76	74	78
1735	1013	Cooked vegetables, sulphury	Methionol	V38	ns	ns	ns	47	48	45	50
1837	1267	Stewed fruit, flowery	2-Phenylethyl acetate	V43	ns	ns	ns	63	57	58	63
1860	1174	Fatty, stable	Hexanoic acid	V44	ns	ns	ns	75	75	75	75
1903	1071	Fruity, floral, sweet	Bencyl alcohol	V46	ns	ns	ns	50	44	44	50
1929	1175	Roses	2-Phenylethanol	V47	ns	ns	ns	81	76	79	77
2047	1291	Spicy, sweet	4-Ethylguaiaicol	V52	ns	*	ns	52	61	71	41
2086		Sweet, spicy	ni	V55	ns	ns	ns	82	57	71	69
2194	1165	Leather, stable	4-Ethylphenol	V64	ns	ns	ns	64	55	63	56
2210	1095	Smoked, spicy, curry	Sotolon	V66	ns	ns	ns	78	81	84	75
2246	1279	Smoked, spicy	4-Vinylguaiaicol	V68	ns	ns	ns	57	33	41	50
2285	1451	Fatty, stable	Decanoic acid	V71	ns	ns	ns	76	61	73	64
<i>Average MF &lt; 50%</i>											
905	719	Fruity	Ethyl propionate	V1	ns	ns	ns	9	22	18	13
931	721	Fruity	Propyl acetate	V2	ns	ns	ns	44	48	47	46

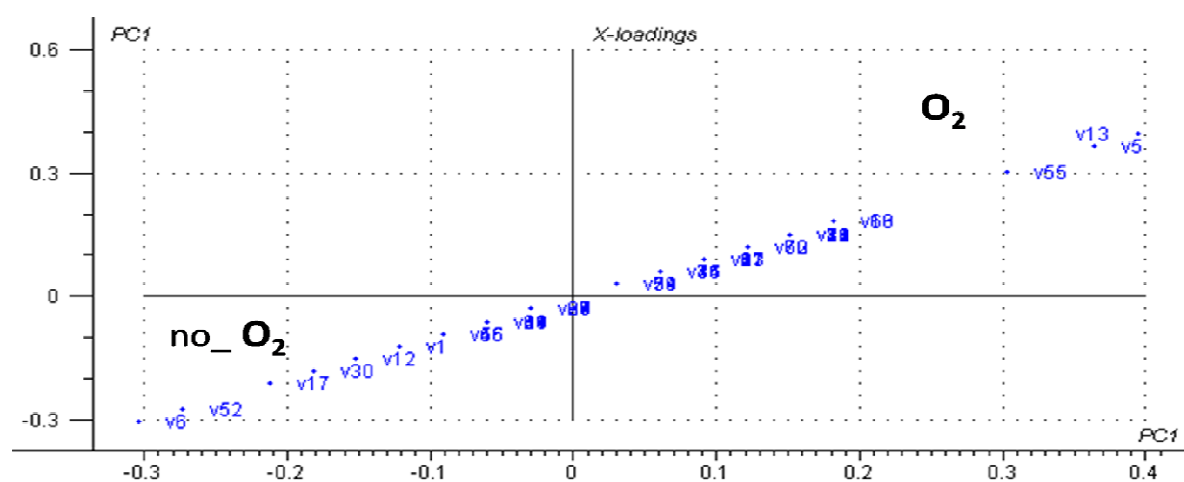
Table 3 Continued

LRI <sub>WAX</sub>	LRI <sub>5</sub>	Description	Identity	RefV	Significance			Ox	no-Ox	Enz	No-Enz
					Int	Ox	Enz				
972		Butter	Diacetyl	V3	ns	ns	ns	17	6	20	3
1074	805	Fruity, sweet, apple	Ethyl 2-methylbutyrate	V5	***	***	**	44	31	40	34
1234		Cooked vegetables	n.i.	V9	ns	ns	ns	18	16	11	22
1280		Butter, lactic	Acetoin	V11	ns	ns	ns	10	0	13	7
1364	889	Flowery, fruity	Hexanol	V15	ns	ns	ns	16	15	13	17
1404	867	Flowery, sweet	<i>c</i> -3-Hexenol	V17	ns	***	ns	21	43	33	30
1440	1190	Fruity, grass, resinous	Ethyl octanoate	V21	ns	ns	ns	17	24	19	22
1494	957	Fruity, flowery	Ethyl 3-hydroxybutyrate	V27	ns	ns	ns	42	47	43	47
1529	909	Fatty, heavy	<i>iso</i> -Butyric acid	V30	ns	ns	ns	9	19	14	14
1653	1090	Flowery	Phenylacetaldehyde	V35	ns	ns	ns	34	26	32	28
1801		Flowery, sweet	Ethyl 4-hydroxybutyrate <sup>a</sup>	V42	ns	ns	ns	22	18	21	30
1880	1118	Smoked, spicy, sweet	Guaiacol	V45	ns	ns	ns	22	29	21	30
2078	1358	Fatty, stable, spicy	Octanoic acid	V54	ns	ns	ns	33	45	38	40
2098		Sweet	n.i.	V56	ns	ns	ns	30	34	40	24
2109	1099	Leather, stable	<i>m</i> -Cresol	V58	ns	ns	ns	31	34	24	41
2171	1476	Spicy, sweet, leather	$\gamma$ -Decalactone	V62	ns	ns	ns	30	18	27	21
2183	1385	Spicy, clover	Eugenol	V63	ns	ns	ns	35	25	34	27
2261	1913	Resinous, dry grass	Ethyl hexadecanoate	V70	ns	ns	ns	19	16	22	16
2333		Phenolic, stable	n.i.	V76	ns	ns	**	28	19	12	35
2360	1496	Spicy, phenolic	Isoeugenol	V77	**	ns	ns	13	20	22	12

LRI<sub>WAX</sub>, LRI<sub>5</sub>: lineal retention indexes on the WAX and DB5 columns; RefV: references for variables; Sig: significance; Int: interaction; OX: oxygen; Enz: enzyme; ni: not identified; ns: not significant; (\*) significant at 10% level; (\*\*) significant at 5% level; (\*\*\*) significant at 1% level; a: tentatively identified.

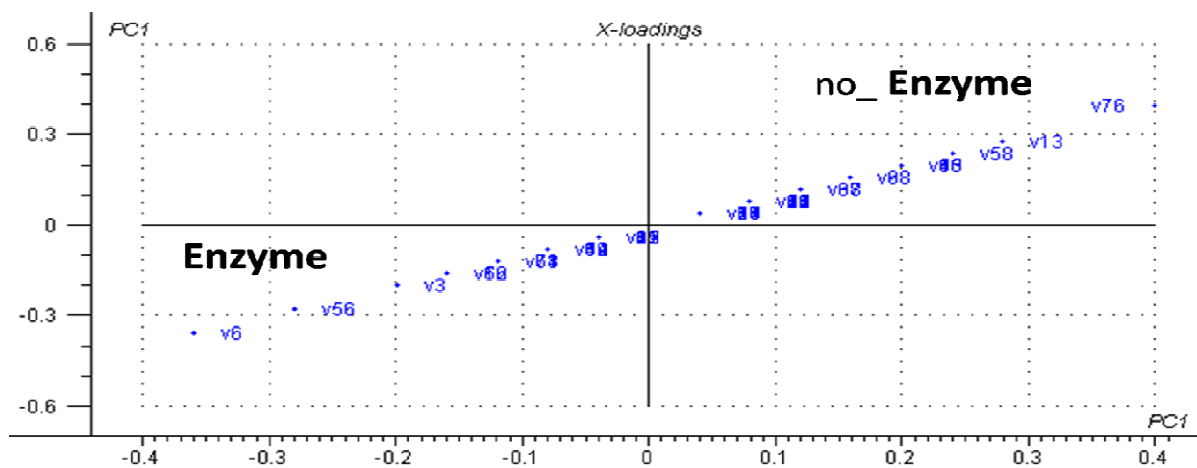


**Figure 1** Schematic representation of the experimental design



**Figure 2** Projection of olfactometric variables onto the principal component computed for oxygen factor. For identification of variables: see table 4





**Figure 3** Projection of olfactometric variables onto the principal component computed for enzyme factor. For identification of variables: see table 4