



Universitat de Lleida

Regeneración aromática y calidad en manzanas (*Malus domestica* Borkh.) almacenadas en atmósfera controlada con muy bajo nivel de oxígeno.

Rosa Altisent Rosell

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

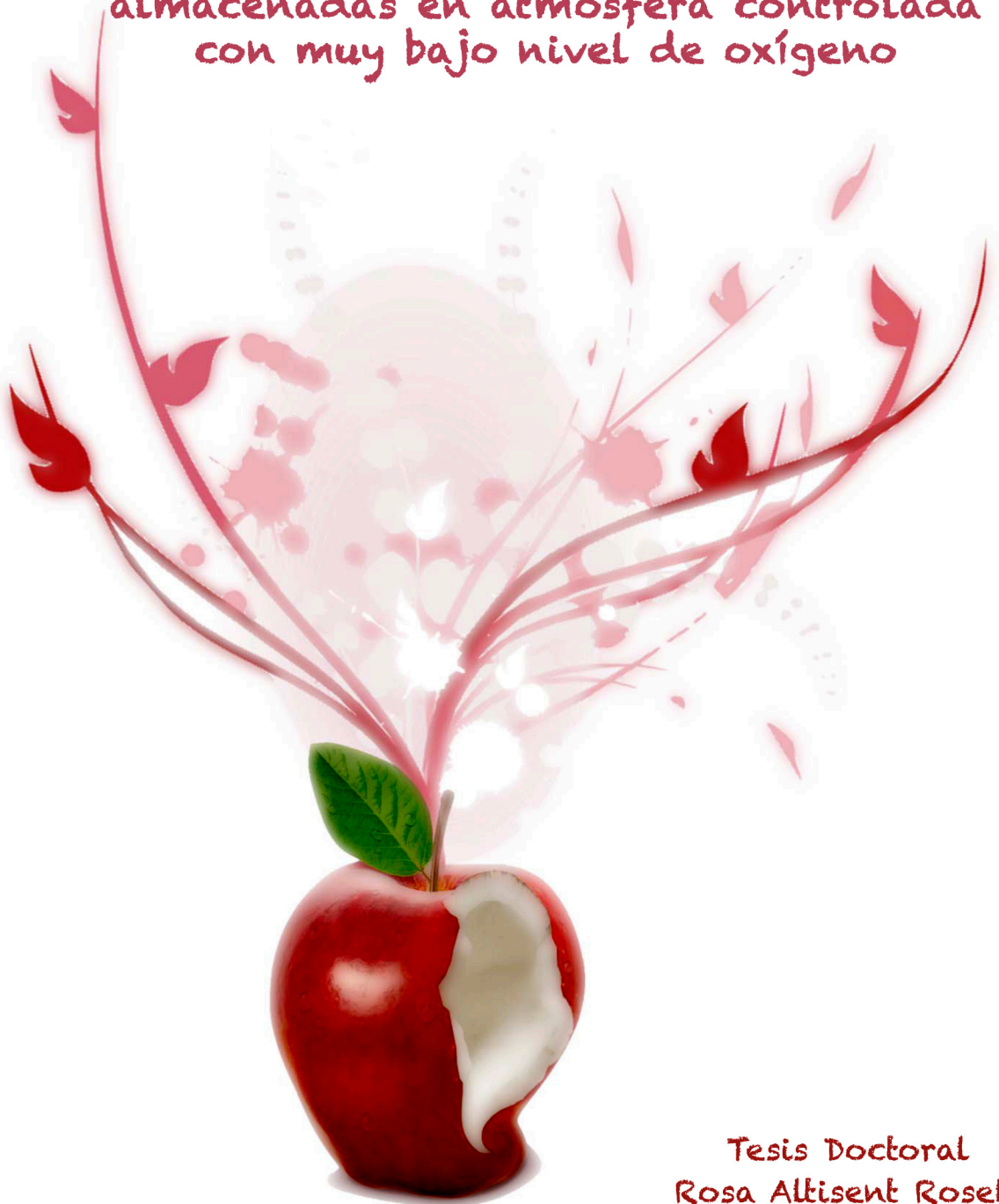
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Lleida
Departament de Tecnologia
d'Aliments

Regeneración aromática y calidad en
manzanas (*Malus domestica* Borkh.)
almacenadas en atmósfera controlada
con muy bajo nivel de oxígeno



Tesis Doctoral
Rosa Altisent Rosell



UNIVERSITAT DE LLEIDA
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia d'Aliments

Programa de Doctorado
'Sistemas Agrícolas, Forestales y Alimentarios'

Regeneración aromática y calidad en
manzanas (*Malus domestica* Borkh.)
almacenadas en atmósfera controlada con
muy bajo nivel de oxígeno.

Memoria presentada por:

Rosa Altisent Rosell

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Lleida

Directores:

Dr. Jordi Graell Sarlé

Dra. Gemma Echeverría Cortada

Lleida, marzo 2010

La presente memoria de Tesis Doctoral que lleva por título ‘Regeneración aromática y calidad en manzanas (*Malus domestica* Borkh) almacenadas en atmósfera controlada con muy bajo nivel de oxígeno’ es presentada por **Rosa Altisent Rosell**, estudiante del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida, para poder optar al grado de Doctora. La parte experimental se ha realizado en el Centro IRTA de Lleida, financiada mediante una beca del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección del Dr. **Jordi Graell Sarlé** y de la Dra. **Gemma Echeverría Cortada**. Ambos autorizan la presentación de la memoria de Tesis ya que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Jordi Graell Sarlé
Director de Tesis

Gemma Echeverría Cortada
Directora de Tesis

Rosa Altisent Rosell
Doctoranda

Lleida, marzo de 2010

*Als meus pares
pel seu suport incondicional
A l'Estanis
per ser la llum que m'il·lumina el camí i molt més.*

L'encant indefinit en una dona
és com el perfum per a la flor
i el sabor per a la fruita.
Perquè la bellesa no ho és tot
per a la flor ni per la fruita.

Alexandre Dumas
'El comte de Montecristo'

AGRADECIMIENTOS / AGRAÏMENTS / ACKNOWLEDGEMENTS

Durante estos últimos años son muchas las personas que de una forma u otra han colaborado en la elaboración de esta tesis, a todos ellos quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lloc, m'agradaria agrair als meus directors de tesi, la Dra. Gemma Echeverría i el Dr. Jordi Graell per haver dipositat en mi la confiança necessària per a realitzar aquest treball. Gràcies pel vostre suport, ajuda, consells, dedicació, suggeriments, correccions i paciència durant aquests anys.

A la Dra. M^a Luisa López Fructuoso pels seus consells i comentaris en la discussió de l'anàlisi dels compostos volàtils i per la seva predisposició en ajudar-me en tot moment. A la Dra. Isabel Lara pel seu assessorament en l'anàlisi de l'activitat enzimàtica i la seva ajuda en la redacció de part dels resultats d'aquesta tesi.

Al Dr. Jaume Puy per ajudar-me en la discussió dels resultats de l'anàlisi multivariant.

Als meus companys i companyes de despatx, de laboratori i d'aventures, Rosa Vilaplana, Carmen Villatoro, M^a Angeles, Giuseppe, Anto, Carme Valentines, Tere per totes les bones estones compartides i les que ens queda per compartir. Espero que la nostra amistat duri per sempre.

A l'IRTA i en particular a l'Àrea de Postcollita per posar a la meva disposició els mitjans materials i humans necessaris.

Al INIA por financiar la beca predoctoral que possibilitó la realización de esta Tesis.

A l'empresa NUFRI S.A.T de Mollerussa (i en especial al Sebastià) que desinteressadament va posar les seves cambres frigorífiques a la meva disposició mentre es va dur a terme aquesta tesi.

To Roger Harker for giving me the chance to work with your team. To all the sensory team, especially to Amy, for being the friend that everyone needs when you are away from home. To Carolyn Norquay to make me feel at home the time that I spent there and also for our friendship.

Al Dr. Carlos Sanz y a la Dra. Ana G. Pérez por brindarme la oportunidad de trabajar con vosotros en el Instituto de la Grasa. Por todo lo que aprendí y los buenos momentos que pasé. Mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Carlos Crisosto y a Gayle Crisosto por ofrecerme la oportunidad de trabajar con vosotros, por estar disponibles siempre para atender mis dudas, por vuestro interés hacia mí y por abrirme las puertas de vuestra casa. Todo lo que hicisteis nunca quedará en el olvido. Muchísimas gracias.

Finalment, agrair als meus pares i a tota la meva família en general per donar-me suport en tot moment, per tenir paciència i mostrar-me sempre el vostre amor incondicional.

A l'Estanis perquè ha estat al meu costat des del començament d'aquesta tesi. Vull agrair-te la teva paciència, els consells i per haver confiat en mi sense excepció.

A TOTS, MOLTES GRÀCIES.

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco de la línea de investigación ‘Calidad organoléptica de nuevas variedades de manzana. Mejora de la tecnología de frigoconservación’, llevada a cabo por el Grupo de Tecnología, Aromas y Calidad Sensorial, del Área de Poscosecha del Centro IRTA de Lleida.

Los trabajos experimentales se han realizado en los laboratorios y en las cámaras frigoríficas del Área de Poscosecha (Centro IRTA de Lleida) y en las cámaras frigoríficas de la empresa NUFRI S.A.T, con la financiación recibida por el INIA.

RESUMEN

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la influencia que ejercía un periodo de 2 ó 4 semanas en frío normal (tras el almacenamiento en condiciones de atmósfera controlada con muy bajo nivel de oxígeno, durante un periodo total de 19 y 30 semanas) sobre la producción de compuestos volátiles, la calidad estándar y la calidad sensorial en manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ (campana 2005/06 y 2006/07) y en manzanas ‘Golden Reinders[®]’ (campana 2006/07 y 2007/08). Después de cada periodo de almacenamiento, los frutos se mantuvieron a 20 °C durante 1 y 7 días, fechas en las cuales se realizaron los distintos análisis. El segundo año de Tesis (campana 2006/07) se evaluó también, para ambas variedades, el efecto de 2 fechas de recolección (situadas dentro del intervalo comercial de cosecha en la zona) sobre los parámetros anteriormente citados. Ese mismo año, se determinaron, además, las actividades de las enzimas lipoxigenasa e hidroperóxido liasa relacionadas con la biosíntesis de los compuestos volátiles. Finalmente, se llevo a cabo un estudio con la variedad ‘Golden Reinders[®]’, en el cual se realizó un seguimiento semanal de los distintos parámetros mencionados a lo largo de 28 días de permanencia a 20 °C (después del almacenamiento en cámara durante 30 semanas), para poder así estimar el periodo de vida útil de los frutos.

En general, un periodo de 4 semanas en frío después del almacenamiento en atmósfera controlada fue el tratamiento más efectivo para conseguir un incremento en la concentración total de compuestos volátiles en la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ (para los dos periodos de conservación evaluados). El mismo resultado se observó en la variedad ‘Golden Reinders[®]’, pero sólo tras cortos periodos de conservación (19 semanas); al cabo de 30 semanas de conservación el periodo óptimo en frío normal para producir este aumento fue de 2 semanas. Entre los compuestos volátiles que vieron aumentada su concentración se encontraban aquellos compuestos considerados característicos del aroma de cada variedad. Esta mayor emisión de compuestos volátiles estuvo relacionada sobre todo con una mayor actividad de la enzima lipoxigenasa (LOX) en la pulpa del fruto, en ambas variedades.

Con relación a los parámetros de calidad estándar de las manzanas, los periodos en atmósfera de frío normal que se ensayaron provocaron un descenso de los valores de firmeza de pulpa y acidez titulable en ambas variedades, aunque fue más evidente en el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’.

En ambas variedades, el aumento en la concentración de compuestos volátiles no se tradujo en cambios significativos en el grado de *aceptación organoléptica* por parte de los consumidores. Además, el atributo de *sabor* (medido mediante un panel de jueces entrenados) tampoco se vio potenciado. En general, las manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ no presentaron cambios en el perfil sensorial, mientras que las manzanas ‘Golden Reinders[®]’ presentaron un descenso en los atributos de *acidez*, *firmeza* y *crocantidad* al ser sometidas al almacenamiento con un periodo en frío.

La respuesta de ambas variedades al periodo en frío fue similar en las dos campañas estudiadas; por otra parte, no se observó una influencia de la fecha de recolección sobre dicha respuesta.

Con respecto a la estimación del periodo de vida útil de las manzanas ‘Golden Reinders[®]’, se obtuvo que éste debería situarse entre 7 y 14 días (de permanencia a 20 °C tras el almacenamiento), momento en el que los frutos presentaban un adecuado balance entre concentración de compuestos volátiles y valores de los parámetros de calidad estándar, lo que permitió alcanzar una satisfactoria aceptación sensorial de los mismos.

RESUM

L'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral va ser avaluar la influència que exercia un període de 2 o 4 setmanes en fred normal (després de l'emmagatzematge en condicions d'atmosfera controlada amb molt baix nivell d'oxigen, durant un període total de 19 i 30 setmanes) sobre la producció de compostos volàtils, la qualitat estàndard i la qualitat sensorial en pomes 'Fuji Kiku[®] 8' (campanya 2005/06 i 2006/07) i en pomes 'Golden Reinders[®]' (campanya 2006/07 i 2007/08). Després de cada període d'emmagatzematge, els fruits es van mantenir a 20 °C durant 1 i 7 dies, dates en les quals es van realitzar els diferents anàlisis. El segon any de Tesi (campanya 2006/07) es va avaluar també, per a totes dues varietats, l'efecte de 2 dates de collita (situades dins l'interval comercial de collita a la zona) sobre els paràmetres anteriorment esmentats. Aquell mateix any, es van determinar, a més, les activitats dels enzims lipoxigenasa i hidroperòxid liasa relacionades amb la biosíntesi dels compostos volàtils. Finalment, es va dur a terme un estudi amb la varietat 'Golden Reinders[®]', en el qual es va realitzar un seguiment setmanal dels diferents paràmetres esmentats al llarg de 28 dies de permanència a 20 °C (després de l'emmagatzematge en cambra durant 30 setmanes), per poder així estimar el període de vida útil dels fruits.

En general, un període de 4 setmanes en fred després de l'emmagatzematge en atmosfera controlada va ser el tractament més efectiu per aconseguir un increment en la concentració total de compostos volàtils en la varietat 'Fuji Kiku[®] 8' (per als dos períodes de conservació avaluats). El mateix resultat es va observar en la varietat 'Golden Reinders[®]', però només després de curts períodes de conservació (19 setmanes); al cap de 30 setmanes de conservació el període òptim en fred normal per produir aquest augment va ser de 2 setmanes. Entre els compostos volàtils que van veure augmentada la seva concentració es trobaven aquells compostos considerats característics de l'aroma de cada varietat. Aquesta major emissió de compostos volàtils va estar relacionada sobretot amb una major activitat de l'enzim lipoxigenasa (LOX) a la polpa del fruit, en ambdues varietats.

En relació als paràmetres de qualitat estàndard de les pomes, els períodes en atmosfera de fred normal que es van assajar van provocar un descens dels valors de fermesa de polpa i acidesa titulable en ambdues varietats, encara que va ser més notable en el cas de la varietat 'Golden Reinders[®]'.

En totes dues varietats, l'augment en la concentració de compostos volàtils no es va traduir en canvis significatius en el grau d'*acceptació organolèptica* per part dels consumidors. A més, l'atribut de *sabor* (mesurat mitjançant un panell de jutges entrenats) tampoc es va veure potenciat. En general, les pomes 'Fuji Kiku[®] 8' no van presentar canvis en el perfil sensorial, mentre que les pomes 'Golden Reinders[®]' van presentar un descens en els atributs d'*acidesa*, *fermesa* i *crocanticitat* en ser sotmeses a l'emmagatzematge amb un període addicional en fred.

La resposta de les dues varietats al període en fred va ser similar en les dues campanyes estudiades; per altra banda, no es va observar una influència de la data de collita sobre aquesta resposta.

Pel que fa a l'estimació del període de vida útil de les pomes 'Golden Reinders[®]', es va obtenir que aquest hauria de situar-se entre 7 i 14 dies (de permanència a 20 °C després de l'emmagatzematge), moment en què els fruits presentaven un adequat balanç entre la concentració de compostos volàtils i els valors dels paràmetres de qualitat estàndard, el que va permetre assolir una satisfactòria acceptació sensorial dels mateixos.

SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to evaluate the influence of 2 and 4 weeks of cold air storage (after controlled atmosphere storage with very low oxygen levels-ULO, for a total period of 19 and 30 weeks) on the production of volatile compounds, standard and sensory quality in 'Fuji Kiku[®] 8' (2005/06 and 2006/07) and 'Golden Reinders[®]' (2006/07 and 2007/08) apples. After each storage period, fruit were kept at 20 °C for 1 and 7 days, before the different analysis were carried out. In the second year (2006/07), the effect of 2 harvest dates (located within the commercial window of the area) on the parameters mentioned above was also evaluated for both varieties. In addition, the lipoxygenase and hydroperoxide lyase activity related to the biosynthesis of volatile compounds were determined in the same year. Finally, we performed a study with 'Golden Reinders[®]' apples, weekly monitoring the different parameters during 28 days at 20 °C (after 30 weeks of ULO storage) in order to estimate the shelf-life of the fruit.

In general, a period of 4 weeks in cold air after ULO storage was the most effective period to increase the total volatile compounds emission in 'Fuji Kiku[®] 8' apples (for both storage periods). The same pattern was observed for 'Golden Reinders[®]' apples but only after 19 weeks of storage. After 30 weeks of storage, a 2-week period under cold air was needed to reach the desired increase. Within these periods in cold air, an increase in the concentration of those volatile compounds characteristic for each variety was observed. This improved emission of volatile compounds was associated with increased activity of lipoxygenase enzyme in the fruit pulp for both varieties.

The standard quality of the fruit was also affected by the cold period which caused a decrease of the flesh firmness and acidity for both varieties, especially in 'Golden Reinders[®]' apples.

For both varieties, the increase in the total emission of volatile compounds was not corresponding with significant changes in the consumer's acceptance. In addition, flavour (measured by a trained panel) was not enhanced. In general, the sensory profile for 'Fuji Kiku[®] 8' apples was not modified. However, for 'Golden Reinders[®]' apples the period under cold air caused a decrease in the sourness, firmness and crispness perceived by a trained panel.

The response of both varieties to the period in cold air after ULO storage was similar over two consecutive seasons and for the different harvest dates.

The optimal period at 20 °C after removal from ULO storage for 'Golden Reinders[®]' apples, was between 7 and 14 days, when fruit showed the proper balance between volatile compounds and standard quality resulting in a satisfactory sensory acceptance.

ABREVIATURAS

AAT	Alcohol o-aciltransferasa (EC 2.3.1.84)
AC	Atmosfera controlada
ADH	Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)
AIR	Aire atmosférico
ANOVA	Análisis de varianza
C1, C2	Cosecha 1, Cosecha 2
CA	Controlled atmosphere
CoA	Coenzim A
CTIFL	Centre Technique Interprofessionel des Fruits et Légumes
DAR	Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural
DCA	Dynamic controlled atmosphere
ddpf	Días después de plena floración
DPA	Difenilamina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
FN	Frío normal
GC	Cromatografía de gases
MS	Espectrometría de masas
HPL	Hidroperóxido liasa (EC no asignado)
HR	Humedad relativa
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
LO	Low Oxygen
LOX	Lipoxigenasa (EC 2.13.11.12)
LSD	Least Significant Difference
1-MCP	1-metilciclopropeno
MES	Àcid morfolino-età-sulfònic
NADH	Nicotinadenin-dinucleòtid (forma reduïda)
NAD(P)H	Nicotinamina Adenina Dinucleòtido Fosfato (forma reduïda)
PCA	Principal Component Analysis
PDC	Piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1)
PLSR	Partial Least Square Regression
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SSC	Soluble Solid Content
T^a	Temperatura
U.a	Unidad de actividad enzimática
UdL	Universitat de Lleida
UE	Unión Europea 27
ULO	Ultra Low Oxygen
UV/Vis	Ultravioleta-visible

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. Situación del sector productor de manzana.....	9
2.2. Características de las variedades de manzana ‘Fuji’ y ‘Golden Reinders®’..	10
2.3. Calidad de las manzanas.....	12
2.3.1. Calidad estándar.....	14
2.3.2. Calidad aromática.....	17
Compuestos volátiles.....	18
Biosíntesis de compuestos volátiles.....	20
Factores que afectan la producción de compuestos volátiles.....	24
Métodos de análisis.....	28
2.3.3. Calidad sensorial.....	30
Atributos sensoriales.....	31
Métodos de análisis sensorial.....	32
2.4. Tecnología de conservación: atmósferas controladas con muy bajo nivel de oxígeno.....	34
4.1. Efecto sobre la calidad estándar.....	36
4.2. Efecto sobre la calidad aromática.....	38
4.3. Efecto sobre la calidad sensorial.....	41
2.5. Técnicas de regeneración del aroma en frutos almacenados en cámara.....	42
5.1. Fecha de recolección más avanzada.....	42
5.2. Tratamiento con etileno.....	43
5.3. Tratamiento con precursores de aromas.....	43
5.4. Tratamientos con anaerobiosis.....	44
5.5. Almacenamiento en frío normal después de la conservación en AC.....	45
2.6. Bibliografía.....	46
3. OBJETIVOS.....	65
4. PLAN DE TRABAJO.....	69
5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MATERIAL.....	73
5.1. Diseño experimental.....	73
5.2. Material vegetal.....	78
5.3. Datos climáticos.....	79
5.4. Cámaras frigoríficas.....	80
6. RESULTADOS.....	83
Capítulo 1.	
Regeneration of volatile compounds in ‘Fuji’ apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability.....	85

Capítulo 2	
Verification of the aroma regeneration influence on consumer acceptance in 'Fuji' apples over two seasons.....	109
Capítulo 3	
Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of 'Fuji' apple.....	133
Capítulo 4	
Evaluación de la influencia del estado de madurez en cosecha sobre la regeneración de compuestos volátiles y los atributos sensoriales en manzanas después del almacenamiento en atmósfera controlada ULO.....	155
Capítulo 5	
Short-term period under air after ultra low oxygen storage modifies volatile substances released by 'Golden Reinders [®] ' apples over two seasons: effects on sensory quality.....	195
Capítulo 6	
Straight-chain esters heightened after ultra low oxygen storage and its relation to the lipoxygenase system in 'Golden Reinders [®] ' apples.....	219
Capítulo 7	
Shelf-life Potential of 'Golden Reinders [®] ' Apples after Ultra Low Oxygen Storage: Effect on Aroma Volatile Compounds, Standard Quality Parameters, Sensory Attributes and Acceptability.....	245
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	271
7.1. Emisión de compuestos volátiles.....	271
7.2. Calidad estándar.....	287
7.3. Calidad sensorial.....	293
7.4. Bibliografía.....	297
8. CONCLUSIONES.....	309
9. ANEJO.....	313



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

En el contexto de la actual política agrícola europea y española se hace especial hincapié en la potenciación de la calidad y la seguridad de las frutas y hortalizas como estrategia esencial para poder competir en el sector mundial. También las diferentes organizaciones españolas de productores y comercializadores de productos hortofrutícolas asumen que la mejora de la calidad y la seguridad del producto es una de las respuestas obligadas para mantener y/o aumentar las posiciones en el mercado interno o externo, y así aumentar la competitividad de las empresas, y en definitiva asegurar las rentas de los productores de frutas y hortalizas en un mercado cada vez más competitivo y globalizado.

Encuestas de opinión realizadas a lo largo de los últimos años ponen de manifiesto que el consumidor tradicional de fruta percibe una pérdida de calidad sensorial en la fruta producida hoy día con respecto a la producida hace unos años, lo que causa una disminución en su consumo (Wyllie, 2008) y una sustitución por otros productos alternativos, principalmente los derivados lácteos (Beltrán y Cuadrado, 2000).

Ante dicho escenario de competencia, una estrategia clave es disponer de frutos con una excelente calidad, entendiendo esta calidad en un sentido global que incluya aspectos comerciales, aspectos sanitarios, aspectos nutritivos, aspectos higiénicos y, sobre todo, aspectos organolépticos. La mejora de esta calidad global de la fruta ha de permitir mantener o reactivar su consumo.

La fruta (y especialmente la fruta de calidad) se identifica como un producto de futuro, es decir, como un producto que va a continuar desarrollándose fuertemente en los próximos años. En los países desarrollados, el consumidor desea, básicamente, unos frutos que presenten unos excelentes atributos organolépticos, que estén libres de residuos nocivos y que aporten nutrientes necesarios para el organismo humano. En este sentido, la fruta fresca debe asociarse a un producto natural, sin manipulaciones y beneficioso para la salud.

Al respecto, entre las medidas posibles que se están abordando por parte del sector cabe señalar la introducción de nuevas variedades que permiten diversificar la oferta varietal, en cuanto a épocas de cosecha y de comercialización así como en características de calidad. Como ejemplo de esta acción, en España podemos citar el

continuo aumento de las variedades de manzana del grupo ‘Gala’ y, de forma incipiente aún, de alguna variedad tardía como ‘Fuji’, que si bien se produce poco en España, es previsible su crecimiento futuro dado la aparición de nuevos clones mejor adaptados a nuestras condiciones. Para el éxito de estas variedades en el sector, obviamente se tiene que cumplir que sea correcta su adaptación productiva en las zonas de cultivo y que su frigoconservación no presente problemas técnicos.

De todas maneras, a pesar del cambio hacia estas nuevas variedades, no hay que olvidar que en España las principales variedades producidas son las del grupo ‘Golden’ (que representan casi el 50% del total de la producción). Estas variedades presentan claras ventajas, como una buena producción, buen calibre, color amarillo atractivo, buena calidad organoléptica (frente a la falta de color y tendencia a harinosidad de las variedades ‘Delicious’), y una buena aptitud a la frigoconservación a largo plazo (especialmente en atmósfera controlada), que permite flexibilizar su almacenamiento y su salida progresiva al mercado a lo largo de 8-9 meses.

La tecnología de atmósfera controlada consiste en una modificación de la composición del aire ambiente reduciendo el nivel de oxígeno y aumentando la concentración del dióxido de carbono. Estas atmósferas permiten extender la vida poscosecha de los frutos basada principalmente en la apariencia externa y los parámetros de calidad (firmeza, acidez, contenido de sólidos solubles). Investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sitúan los niveles de oxígeno alrededor del 2% o incluso más bajos. Cuando los niveles están entre 1,8-2% se denominan atmósferas LO (‘Low Oxygen’) mientras que con niveles entre 1-1,2% se denominan atmósferas ULO (‘Ultra Low Oxygen’). Ahora bien, estas atmósferas provocan un descenso en la producción de compuestos volátiles, y consecuentemente en el sabor de los frutos (Plotto y col., 1999, 2000; López y col., 2000; Fellman y col., 2000, 2003; Echeverría y col., 2004a, b). Por ejemplo, en diferentes estudios de consumo de dichas manzanas se suelen obtener respuestas en el sentido de "falta de sabor", "no sabe a manzana", "no tiene el aroma de manzana fresca", en concordancia con la baja emisión de ciertos compuestos volátiles determinados en el laboratorio. Se define así un nuevo perfil de consumidores de frutas como aquel que considera ‘fruta de calidad’ aquella que tiene un buen aspecto, textura, sabor y alto valor nutritivo (Brückner, 2008).

Aparte de la mejor retención de la calidad del fruto y de la prolongación de su conservación, una gran ventaja de la aplicación de niveles de O₂ tan bajos es el buen

control del escaldado superficial de las manzanas, especialmente en manzanas del grupo ‘Golden’ y del grupo ‘Delicious’. Tanto es así, que ello ha resultado ser una alternativa no contaminante frente al uso de antiescaldantes químicos que habitualmente se utilizan para duchar o bañar los frutos antes de su entrada en cámara frigorífica, y cuyas aguas de tratamiento suponen un problema medioambiental y sus residuos en la piel y pulpa de los frutos representan un riesgo para la salud del consumidor, dadas las características toxicológicas que se han señalado para dichos productos químicos. Esta ventaja resulta cada vez más crucial para el éxito en la comercialización de dicha fruta hacia mercados exigentes en cuestión de seguridad y salud, como son los países europeos, y entre ellos España.

En resumen, hay un problema evidente de falta de calidad en las manzanas frigoconservadas en atmósferas controladas durante varios meses, y hay poca información técnica sobre como regenerar, aumentar la producción de aromas en las manzanas que han sido almacenadas en atmósferas ULO, y como mejorar los atributos sensoriales de dichos frutos, para que cuando lleguen al consumidor produzcan un mayor grado de satisfacción.

La presente Tesis trata de resolver, mediante la optimización de la tecnología de frigoconservación, la falta de calidad sensorial y la menor producción de aromas que presentan las manzanas al final de su almacenamiento en atmósferas controladas con bajo nivel de O₂ durante varios meses, y conseguir que las mismas tengan unos adecuados atributos sensoriales en el momento de su llegada al consumidor, y así poder asegurar el éxito en su comercialización. El estudio se realizará en las variedades ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’.

Antecedentes



2. ANTECEDENTES.

2.1. Situación del sector productor de manzana.

La producción de manzana ha aumentado de forma constante hasta duplicarse en los últimos 30 años, superando, en la entrada del siglo XXI, los 60 millones de toneladas de producción mundial. Concretamente, en 2006, la producción fue de 63.804.534 toneladas (FAOSTAT, 2009).

China es el mayor productor de manzana, aportando el 41% de la producción mundial. En 2006 produjo poco más de 26 millones de toneladas. Como segundo país productor en el mundo destacan los Estados Unidos con 4,5 millones de toneladas (7%). La Unión Europea (UE) contribuye con el 15% de la producción mundial.

Dentro de la UE en el año 2006, cabe resaltar la importancia de Polonia, con una producción de 2,3 millones de toneladas, seguida por Italia y Francia con producciones alrededor de 2 y 1,5 millones de toneladas, respectivamente. España se situaba en quinto lugar con una producción de 547 mil toneladas (FAOSTAT, 2009).

La distribución geográfica dentro de España indica una concentración del manzano muy importante en el Valle del Ebro, principalmente en Cataluña y Aragón aportando el 60-70% de la superficie total. La principal zona productora de manzana de Cataluña es la provincia de Lleida con una producción en 2008 de 299.782 toneladas y un avance para el 2009 de 240.000 toneladas. La siguiente área productiva dentro de Cataluña es la zona de Girona. En 2007, esta provincia produjo 91.049 toneladas de manzanas. Las provincias de Tarragona y Barcelona son minoritarias, produciendo poco más de 2.000 toneladas cada una (DAR, 2009).

En referencia a las variedades más cultivadas en el mundo en el año 2006 destacan ‘Red Delicious’ (19,3%), ‘Golden Delicious’ (18,8%), ‘Gala’ (12,6%), ‘Fuji’ (6,7%) y ‘Granny Smith’ (6,0%) (World Apple Review, 2007). Dentro de la UE la variedad más cultivada es ‘Golden’ con un 24,6%, después le siguen las variedades ‘Gala’ (10,5%), ‘Jonagold’ (9,1%) y ‘Red Delicious’ (6,6%), entre otras (World Apple Review, 2007).

Dentro de España (años 2006-2008) destaca el grupo ‘Golden’ con un 51% de la producción, en segundo lugar están las variedades del grupo ‘Gala’ (23%) y en tercer lugar encontramos ‘Red Delicious’ (11%). La variedad ‘Fuji’ se encuentra con un 6%. La tendencia varietal en el grupo ‘Golden’ ha ido hacia la plantación de variedades

menos sensibles al ‘russeting’, alteración que afecta su valor comercial, como por ejemplo ‘Golden Reinders[®]’. Por otra parte, en el caso de las variedades del grupo ‘Gala’ y del grupo ‘Delicious’, la tendencia ha ido hacia variedades de mejor coloración, para contrarrestar los efectos negativos de las elevadas temperaturas en el periodo estival (WAPA, 2008).

El grupo ‘Golden’ es la variedad mayoritaria dentro del área de Lleida, ocupando un 57% de la superficie productiva. En el grupo ‘Golden’ se engloban una serie de clones derivados de ‘Golden Delicious’ como ‘Golden Smoothee[®]’, ‘Golden Reinders[®]’, ‘Golden Criellard[®]’, ‘Golden 972’, ‘Belgolden[®]’, etc. El grupo ‘Gala’ y otras variedades de verano quedan en segundo plano con una superficie de un 19%. La variedad ‘Fuji’ ocupa un 8% de la superficie productiva en la zona de Lleida (DAR, 2009).

2.2. Características de las variedades de manzana ‘Fuji’ v ‘Golden Reinders[®]’.

La variedad ‘Fuji’ procede del cruce de ‘Ralls Janet’ y ‘Golden Delicious’ realizado el año 1939 por Niitsu en la ‘Fruit Tree Research Station’ de Morioka. A partir de 1958 empezó a producirse en plantaciones comerciales y en 1962 fue registrada con el nombre de ‘Fuji’. El árbol de esta variedad se caracteriza por un vigor superior a ‘Golden Delicious’, una rápida entrada en producción y una elevada productividad, a pesar de su alta sensibilidad a la alternancia (Iglesias y col., 2000). Los frutos se caracterizan por ser de calibre medio-alto, de forma ligeramente aplastada y de color rojo-pardo (Figura 1), según las condiciones de cultivo. Los frutos presentan una pulpa con excelente sabor y textura (crocante, dulce y aromática) y un óptimo comportamiento en poscosecha.

Uno de los principales problemas de la variedad en la zona de Lleida es la deficiente coloración, por lo que se han obtenido un elevado número de selecciones de mayor coloración en las últimas décadas, principalmente en Japón (Kikuchi y col., 1997; Drake y Elfving, 1999). El color superficial es un factor importante para la comercialización de manzanas ‘Fuji’, debido a que el insuficiente desarrollo de color rojo está generalmente asociado a una baja aceptación visual por parte del consumidor (Cliff y col., 1998); ello conlleva que la recolección se realice de forma progresiva, de acuerdo al desarrollo del color, para así aumentar su valor en el mercado (Marsh y col.,

1996). Este hecho es especialmente relevante dado que, en esta variedad, el color tiene una incidencia decisiva en el precio del producto final. La aparición de color rojo está asociado con las condiciones climáticas así como con las técnicas de cultivo (fertilización, sistema de formación, aclareo) aplicadas en la época de crecimiento, especialmente durante el período de maduración en el árbol (Stampar y col., 2002). En muchos casos la coloración roja tiene lugar tarde o incluso después de la fecha óptima de recolección, lo que puede ser problemático para largos almacenamientos (Veberic y col., 2007). Algunos autores han demostrado que en años con temperaturas más bajas y humedad relativa más alta, la coloración es más elevada (Veberic y col., 2007). En la zona de Lleida, esta falta de color está causada por veranos cálidos y secos durante el periodo de crecimiento (Iglesias y col., 2000). En un estudio realizado con diferentes clones de ‘Fuji’ (‘Fuji Kiku[®] 7’, ‘Fuji Kiku[®] 8’, ‘Fuji Nagafu[®] 6’) así como con la variedad estándar se demostró que el más alto porcentaje de color se consiguió para el clon ‘Fuji Kiku[®] 8’, con diferencias significativas respecto al resto en dos años consecutivos (Veberic y col., 2007).



Figura 1. Frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’.

‘Golden Reinders[®]’ es un mutante de ‘Golden Delicious’ de difusión reciente originado en Holanda. El fruto presenta unas características muy similares a ‘Golden Delicious’ pero con lenticelas menos aparentes y es ligeramente más resistente a ‘russeting’ (Iglesias y col., 2000). Presenta un tamaño medio, un color amarillento cuando está totalmente maduro, aunque el color verde se mantiene en la cara sombreada (Figura 2). La forma es troncocónica, siendo más redonda en terrenos llanos y más alargada en zonas de montaña. En referencia a los aspectos productivos también hay que

tener en cuenta que ‘Golden Reinders’[®], a diferencia de ‘Fuji’, es una variedad conocida por su poca tendencia a la alternancia entre los años de producción. Sin embargo, un estudio demostró que los parámetros de calidad del fruto son mejores en los años de baja producción que en los de elevada. En el caso de ‘Golden Reinders’[®], el peso, el diámetro, la altura y firmeza del fruto aumentaban un 5,0%, 3,8%, 6,6% y 3,9%, respectivamente, en los años de baja producción (Racsó y col., 2006).



Figura 2. Frutos de la variedad ‘Golden Reinders’[®].

La pulpa es dorada, de textura fina y jugosa. Es dulce, ligeramente ácida y aromática. Uno de los puntos débiles de los frutos cultivados en las zonas cálidas es su baja firmeza y la elevada sensibilidad a las manipulaciones. Se caracteriza por tener menos sabor y un menor rendimiento que ‘Golden Delicious’. Un estudio realizado para determinar las características productivas y organolépticas de nuevas variedades (Milosevic y col., 2009) reveló que ‘Golden Reinders’[®] presentaba el calibre más alto (superior a 70 mm) y el mayor contenido en sólidos solubles (16 °Brix) en comparación con ‘Mondial Gala’[®], ‘Galaxy’[®], ‘Braeburn’ y ‘Jonathan Watson’. En otro trabajo, esta variedad también destacó por obtener una mayor satisfacción en encuestas de consumidores, durante tres años consecutivos (Racsó y col., 2009).

2.3. Calidad de las manzanas.

Habitualmente, la calidad de los frutos está definida por una serie de atributos como la apariencia, la textura, el sabor y la ausencia de desórdenes fisiológicos y patológicos. Hasta ahora, la mayoría de las estrategias para determinar las condiciones óptimas para la cosecha y el almacenamiento de manzanas estaban basadas en mantener ciertas especificaciones de calidad como el color, la firmeza, la acidez y el contenido en

sólidos solubles. Sin embargo, a lo largo de los años, la falta de calidad sensorial mostrada por una gran cantidad de frutas ha provocado una caída en las expectativas de los consumidores y como consecuencia un significativo descenso en las ventas.

El concepto de calidad ha ido evolucionando a lo largo de los años. De la idea original basada en el producto final sin tener en cuenta el proceso, ha ido modificándose prestando más atención a los estadios previos de la producción con el objetivo de identificar los problemas con anterioridad. Además, aparte del esfuerzo en mantener los parámetros de calidad físico-química instrumental ahora se presta atención a optimizar los atributos sensoriales para aumentar la aceptación por parte de los consumidores (Brückner, 2008). Diversos estudios previos han demostrado que la determinación de la calidad óptima para diferentes variedades de manzana basada en los parámetros usuales (color, calibre, contenido de sólidos solubles y acidez) puede no ser suficiente para conseguir la calidad óptima sensorial deseada por los consumidores (Echeverría y col., 2004a; Mehinagic y col., 2006; López y col., 2007). Otro aspecto a destacar es que los programas de mejora genética de variedades se han basado generalmente en potenciar aquellos atributos relacionados con la adaptación a largos periodos de almacenamiento y al transporte, que favorecen el aspecto visual y la resistencia a la manipulación, olvidándose de otros aspectos como el gusto y el aroma (Goff y Klee, 2006; Tieman y col., 2006; Whitaker, 2008). Sin embargo, el gusto y el aroma tienen un papel muy importante cuando los productores quieren obtener un valor extra de sus productos ya que la aceptación por parte del consumidor está marcada por estos atributos. En la actualidad, los programas de mejora incluyen estos aspectos a la hora de seleccionar variedades.

En el contexto de la presente Tesis, se consideran tres tipos de calidad: estándar, aromática y sensorial. La calidad estándar es aquella relacionada con parámetros como la firmeza, el contenido de sólidos solubles, la acidez, el color y con la ausencia de alteraciones. La calidad aromática se refiere a la emisión de los distintos compuestos volátiles característicos para cada variedad. Finalmente, la calidad sensorial es aquella percibida tanto por consumidores como por un panel de jueces entrenados capaces de puntuar la aceptación de los frutos así como valorar los distintos atributos sensoriales, respectivamente.

2.3.1. Calidad estándar.

Los índices de calidad utilizados habitualmente para determinar la fecha óptima de recolección de las manzanas son el índice de almidón, el calibre, el color de la piel, la firmeza de la pulpa, el contenido de sólidos solubles, la acidez y la concentración de etileno interno.

En el caso de la manzana ‘Fuji’, la madurez habitual de recolección se sitúa entorno los 185-200 días después de plena floración (ddpf) siendo el índice de almidón y el color de fondo (parámetro a^*+b^*) los mejores indicadores de la madurez del fruto, según diversos autores (Fan y col., 1997; Echeverría y col., 2002). La Tabla 1 muestra los valores recomendados en cosecha para la variedad ‘Fuji’ (Vayesse y Laudry, 2004).

Para la variedad ‘Golden Reinders®’ se sitúa entorno los 144 ddpf. Estudios recientes en ‘Golden’ indican que el mejor índice para determinar el momento óptimo de cosecha es el índice de almidón (Vayesse y Laudry, 2004; Alegre y Casals, 2006) (Tabla 1). Estos autores demostraron que la satisfacción del consumidor también estaba claramente influenciada por el contenido de sólidos solubles aunque éste no puede ser utilizado para definir el período de cosecha ya que no hay relación directa con el grado de maduración (la variación entre años y entre fincas era del mismo orden que la propia variación dentro de una misma finca) (Alegre y Casals, 2006).

Tabla 1. Parámetros óptimos de recolección de manzanas ‘Fuji’ y ‘Golden’.

	Fuji	Golden
Índice de almidón (escala 1-10)	8-9	5-6
Firmeza (kg)	7,5-8,5	7-8
Sólidos Solubles (° Brix)	14-16	11-15
Acidez (g ácido málico L ⁻¹)	3-5	4-6
Color de fondo (código según CTIFL)	F4-F5	C4-C5

La producción de manzana se conserva durante largos periodos de tiempo para ir suministrando progresivamente al mercado la cantidad necesaria y/o deseada. Por lo tanto, si nos centramos en el estudio de la calidad estándar al final del almacenamiento es necesario conocer cuáles deben ser los valores de los diferentes parámetros de calidad -como la firmeza, sólidos solubles, acidez y color- necesarios para satisfacer las necesidades de los consumidores.

En general, la predicción de la aceptabilidad de manzanas basada en los parámetros instrumentales de firmeza, sólidos solubles y acidez depende de la variedad. Para manzanas ‘Golden Delicious’ es posible asegurar su aceptación con un valor de firmeza de 50 N (Hoehn y col., 2003). En manzanas ‘Gala’ el valor de firmeza debe situarse alrededor de 60 N (Hoehn y col., 2003; DeEll y col., 2001). Otro estudio realizado en 4 variedades de manzana (‘Gala’, ‘Fuji’, ‘Golden Delicious’ y ‘Braeburn’) estableció que la firmeza era el factor dominante en la aceptación por parte de los consumidores (Harker y col., 2008). Este estudio mostró que a medida que la firmeza aumentaba de 36 N a 62 N, incrementaba la aceptación; pero a partir de este valor no se observó mejora. Específicamente, para la variedad ‘Fuji’, parecía que el valor firmeza era el que definía la aceptación con poca influencia del contenido de sólidos solubles o de la acidez. Hay muchos factores que afectan a la firmeza de los frutos en el momento de ser consumidos, entre ellos, la propia genética del fruto, factores de crecimiento y de nutrición mineral (Jonson y Ridout, 2000), la madurez en cosecha (De Jager y col., 1996) y las condiciones de almacenamiento poscosecha (Meberg y col., 2000).

Harker y col. (2008) demostraron que el contenido en sólidos solubles y la acidez también juegan un papel importante a la hora de definir la calidad estándar para cada variedad. Según Hoehn y col. (2003), para la variedad ‘Golden’ el valor mínimo del contenido de sólidos solubles y acidez se situaba en unos 12 °Brix y 3,2 g ácido málico/L, respectivamente; mientras que la variedad ‘Gala’ pareció ser independiente de estos parámetros. Otro estudio con ‘Golden Delicious’ situó el contenido de sólidos solubles en 13 °Brix (Harker y col., 2008). Curiosamente, para manzanas firmes (>62 N) de la variedad ‘Golden Delicious’, el contenido en sólidos solubles parecía no afectar, mientras que para manzanas más blandas si el contenido en sólidos solubles era superior a 13 °Brix, la aceptación descendía de un 68% a un 48% (Harker y col., 2008). Ello demuestra que hay ciertas interacciones en los efectos que tienen distintos parámetros sobre la aceptación de los frutos.

En manzanas, el contenido de sólidos solubles y ácidos puede inducir cambios en la calidad, ya que los cambios sensoriales están a menudo acompañados de cambios en la concentración de azúcares y ácidos (Doyon y col., 1991). La composición de azúcares puede influenciar la dulzura del fruto, pero altos contenidos en azúcares no se traducen automáticamente en manzanas sensorialmente dulces ya que el contenido en ácidos orgánicos es también importante en la percepción de la dulzura (Setser y col., 1993).

Para otros frutos (como el kiwi, melocotones, cerezas, uvas y naranjas) se ha establecido que la aceptabilidad por parte del consumidor está relacionada con el contenido de sólidos solubles, la acidez y el ratio sólidos solubles/acidez (Crisosto y Crisosto, 2002; Iglesias y Echeverría, 2009).

Por lo que respecta a las alteraciones fisiológicas observadas, uno de los principales problemas de variedad 'Fuji' en el valle del Ebro son las manchas marrones en la epidermis (llamadas 'golpes de sol') provocadas por un exceso de insolación que deprecian totalmente el fruto. En general, tanto para manzanas 'Fuji' como para 'Golden Delicious', se ha demostrado que los frutos con 'golpes de sol' presentan un aumento de los valores de firmeza y del contenido de sólidos solubles y una disminución de la acidez a medida que la severidad aumenta (Schrader y col., 2009). Otras alteraciones fisiológicas de la variedad 'Fuji' son el oscurecimiento y la formación de cavidades en la pulpa y en el corazón del fruto debido a altos niveles de CO₂ durante el periodo de conservación en frío, aumentando la sensibilidad a dichas alteraciones cuanto más largo es el almacenamiento. Además, temperaturas frescas durante el período de crecimiento del fruto en el árbol aumentan la sensibilidad del fruto a daños por CO₂ (Argenta y col., 2000).

El escaldado superficial es otra alteración importante en manzanas, que aparece durante la prolongación del almacenamiento en ciertas variedades. Las manzanas cultivadas en la zona de Lleida y Aragón tienen una alta sensibilidad a este desorden debido al clima cálido y seco durante la época de crecimiento y cosecha. Para el control del escaldado superficial se hacen habitualmente tratamientos con antiescaldantes como la difenilamina (DPA). Sin embargo, la aplicación de la atmósfera controlada con muy baja concentración de oxígeno (ULO) permite reducir la incidencia de este desorden fisiológico (Brackman y col., 1994; Graell y col., 1997; López y col., 2000; Echeverría y col., 2002). En los últimos años, una nueva técnica llamada 'atmósfera controlada dinámica (DCA)' se ha propuesto como una alternativa no química al tratamiento con DPA para el control del escaldado (Zanella y col., 2005; DeLong y col., 2007). La misma se basa en detectar cuando el fruto se encuentra en condiciones de estrés por bajo oxígeno (mediante medidas de fluorescencia o del contenido de etanol), permitiendo la adopción de niveles de oxígeno más bajos que aquellos establecidos en las condiciones ULO, y que aún son tolerados por los frutos sin experimentar procesos fermentativos; de esta manera, se logra optimizar los beneficios de la atmósfera ULO sin producir

efectos negativos debido a las condiciones anaeróbicas (DeEll y col., 1999; Prange y col., 2003; Gasser y col., 2008).

La principal alteración fisiológica de los frutos de la variedad 'Golden' es la mancha amarga ('bitter pit'). En las lenticelas se observan unas manchas redondas, de 2 a 4 mm de diámetro de un color marrón-oscuro; la superficie de la mancha se deprime, y debajo de ésta se constituye una masa corchosa de un sabor amargo. Las manchas se localizan en la zona calicina, pero su distribución puede ser muy irregular. La citada alteración se produce cuando el contenido y la distribución de calcio en el fruto no es adecuada. Las manzanas requieren un nivel de abastecimiento de calcio relativamente bajo pero continuo a lo largo de su desarrollo para ofrecer una buena producción y evitar posibles desordenes (Benavides y col., 2001). Otra alteración muy importante en manzanas 'Golden Delicious' es la 'plara'; esta alteración se encuentra estrechamente ligada a la mancha amarga, con la que a menudo coexiste y se diferencia de esta última por la menor profundidad de penetración de las manchas. El grupo 'Golden' también es muy sensible a 'russeting', especialmente en años de primaveras húmedas, aunque la variedad 'Golden Reinders[®]' tiene una buena resistencia a dicha alteración. En conservación, es una variedad tolerante a los daños por CO₂ pero muy sensible a la deshidratación en cámara, y, además, muy susceptible a los daños mecánicos debido a la fragilidad de su piel (Iglesias y col., 2000). Uno de los puntos clave que debe tenerse en cuenta en los programas de mejora genética cuando se desarrollan manzanas de piel amarilla, es su sensibilidad a los golpes (Toivonen y col., 2007). La severidad de los daños puede estar afectada por muchos factores aparte del golpe aplicado. La temperatura del fruto en el momento del golpe es muy importante (Thomson y col., 1996; Baritelle y Hyde, 2001).

2.3.2. Calidad aromática.

El aroma de los frutos es resultado de una compleja mezcla de un gran número de compuestos volátiles que contribuyen a la calidad sensorial de cada fruto dependiendo de la especie y variedad (Sanz y col., 1997; Dixon y Hewett, 2000). Estos compuestos son responsables del olor y contribuyen al aroma, la calidad del fruto y su percepción final por parte del consumidor (Baldwin, 2002). Numerosos autores han realizado estudios para caracterizar la composición aromática de diferentes variedades de manzanas como 'Bisbee Delicious' (Mattheis y col., 1995), 'Golden Delicious' y 'Granny

Smith' (López y col., 1998a), 'Starking Delicious' (López y col., 1998b), 'Gala' (Plotto y col., 2000; Lo Scalzo y col., 2003), 'Fuji' (Echeverría y col., 2004a) y 'Pink Lady®' (Lo Bianco y col., 2008; Villatoro y col., 2009), entre otros.

Compuestos volátiles.

En el perfil aromático de las manzanas se han detectado más de 300 compuestos volátiles, entre los cuales se incluyen alcoholes, aldehídos, ésteres carboxílicos, cetonas y éteres (Dimick y Hoskin, 1983), aunque la mayoría son ésteres (78-92%) y alcoholes (6-16%). Los ésteres, derivados de aminoácidos o de ácidos grasos, son importantes en la fracción volátil de los frutos maduros (Dixon y Hewett, 2000; Aharoni y col., 2000; Beekwilder y col., 2004) siendo, además, los responsables de las 'notas frutadas' en el perfil aromático del fruto (Mattheis y col., 1991). En el caso de las variedades 'Pink Lady®' (Villatoro y col., 2009), 'Golden Delicious' (López y col., 1998a), 'Mondial Gala®' (Lara y col., 2007), 'Granny Smith' (Lavilla y col., 1999), 'Fuji' (Echeverría y col., 2004a) y 'Red Delicious' (López y col., 1998b), el contenido de ésteres representa un 77%, 80%, 82%, 88%, 90% y 98%, respectivamente, del total de la fracción emitida.

La producción de volátiles es dependiente de la variedad, el estado de madurez, las condiciones y el periodo de almacenamiento, y las condiciones ambientales durante la distribución comercial (Dixon y Hewett, 2000; Watkins, 2006). Existen grandes diferencias en el sabor y el aroma entre las diferentes variedades de manzana (Poll, 1981). En general, las variedades de piel amarilla producen principalmente ésteres derivados del ácido acético mientras que las variedades de piel roja se consideran más productoras de ésteres derivados del ácido butírico (Paillard, 1979). Los resultados de un estudio realizado con 13 variedades diferentes de manzanas demostraron que las manzanas de piel roja presentaban el mayor contenido de ésteres mientras que las manzanas de piel verde el menor (Mehinagic y col., 2006). Otros autores (Fellman y col., 2000; Miller y col., 1998) también sugieren que la intensidad del color de la piel para la variedad 'Red Delicious', determinada por el contenido de antocianos, podría estar correlacionada con el contenido de ésteres totales.

La contribución de cada compuesto individual al sabor de una variedad específica depende de su umbral olfativo así como de su concentración (Buttery, 1993; Forney y col., 2000), que, a su vez, depende de la actividad de las enzimas relacionadas con su

síntesis y de la disponibilidad de sustratos (Fellman y col., 1993; Sanz y col., 1997). Se define el umbral olfativo como la mínima concentración que es necesaria para que un compuesto se detecte por el olfato humano. Buttery (1993) constató que un compuesto volátil no necesita producirse en altos niveles para causar un impacto en el sabor de un fruto. Esto se explica por el hecho de que la contribución de cada compuesto volátil al aroma viene definida por sus unidades de olor siendo éstas el cociente entre la concentración en el fruto y su umbral de percepción olfativa (mínima concentración que es percibida por el olfato) (Guadagni y col., 1966).

Se asume que los compuestos volátiles con logaritmo decimal (\log_{10}) de las unidades de olor positivo son los que más contribuyen al sabor de los frutos, mientras que los que tienen valores negativos contribuyen sólo proporcionando lo que se denomina 'notas de fondo' (Baldwin, 2000). De todos modos, sólo unos cuantos de los compuestos volátiles emitidos tienen un impacto decisivo en la calidad sensorial de las manzanas, siendo estos designados como 'compuestos impacto' (Cunningham y col., 1986). Aún así, el perfil aromático de un fruto es el resultado de un balance entre todos los compuestos emitidos, y, consecuentemente, cualquier cambio en este balance resultará en cambios en el sabor del fruto y como consecuencia, en la percepción sensorial para parte del consumidor (Mattheis y col., 2005; López y col., 2007; Harb y col., 2008).

En el grupo de los ésteres, el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo y el 2-metilbutanoato de etilo son los compuestos que contribuyen en mayor medida al aroma y sabor característico de muchas variedades de manzanas (Mattheis y col., 1991; Young y col., 1996; Plotto y col., 1999; Fellman y col., 2000; López y col., 2000; Young y col., 2004). Específicamente para 'Golden Delicious', el acetato de butilo, el acetato de hexilo, el butanoato de etilo, el hexanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo y el 2-metilbutanoato de etilo han sido considerados compuestos característicos por varios autores (Kakiuchi y col., 1986; López y col., 1998a; Dixon y Hewett, 2000; López y col., 2000). El acetato de hexilo y el acetato de butilo representan el 60% del total de compuestos volátiles aromáticos en manzanas 'Golden' (Brackmann y col., 1993) y son considerados muy importantes en dicha variedad mientras que otras variedades, como 'Granny Smith', se caracterizan por altas concentraciones de butanoato de etilo y 1-hexanol (Dirinck y Schamp, 1989).

Para la variedad 'Fuji', los principales compuestos son el acetato de hexilo, el butanoato de etilo, el hexanoato de etilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo (Echeverría y col., 2004b). El 2-metilbutanoato de etilo ha sido identificado como un compuesto impactante en variedades de manzana del grupo 'Delicious'. Este compuesto tiene un umbral olfativo muy bajo ($6 \cdot 10^{-6}$ $\mu\text{g L}^{-1}$) (Takeoka y col., 1992) y corresponde a un olor característico a 'manzana intensa' (Flath y col., 1967) y 'madura' (Paillard, 1990).

Biosíntesis de compuestos volátiles.

El desarrollo en las metodologías analíticas ha permitido la caracterización de las complejas mezclas de compuestos volátiles. Aun así, el conocimiento de las rutas biosintéticas involucradas en la formación de compuestos aromáticos en frutos todavía se encuentra un paso atrás (Pérez y Sanz, 2008). La formación de los compuestos volátiles en los frutos se puede estudiar teniendo en cuenta el metabolismo de los tres principales grupos de precursores: carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos. Los principales ésteres producidos durante la maduración de la manzana proceden mayoritariamente del catabolismo de lípidos y aminoácidos (Sanz y col., 1997; Dixon y Hewett, 2000; Fellman y col., 2000; Pérez y Sanz, 2008). Ahora bien, estas rutas biosintéticas presentan interconexiones y la mayoría no están exclusivamente destinadas a la formación de compuestos volátiles sino que también dan lugar a otros metabolitos importantes que tienen diferentes funciones biológicas en las plantas (Pérez y Sanz, 2008). En general, la producción de volátiles es más elevada en la piel que en la pulpa (Knee y Hartfield, 1981; Guadagni y col., 1971; Fan y col., 1997; Rudell y col., 2002; Matich y Rowan, 2007; Lo Bianco y col., 2008), indicando que la actividad enzimática relacionada y la disponibilidad de los principales precursores para la síntesis de compuestos volátiles, como los ácidos grasos, es mayor en aquel tejido (Rudell y col., 2002; Defilippi y col., 2005). Ahora bien, Leshem y col. (1984) observaron una mayor actividad LOX en los tejidos carpelares (entre los carpelos y la línea del corazón). La concentración de aminoácidos y lípidos en la piel del fruto podría representar un factor limitante para la producción de volátiles.

Los ésteres se forman a partir de la esterificación entre los alcoholes y el acetyl CoA derivado del metabolismo de los ácidos grasos y de los aminoácidos. Esta reacción está catalizada por la enzima alcohol *o*-aciltransferasa (AAT; EC 2.3.1.84) (Fellman y

col., 1991; Pérez y col., 1996; Sanz y col., 1997). Los ácidos grasos sirven como precursores en el caso de la síntesis de acetatos lineales, a través de su β -oxidación y con la intervención de la enzima lipoxigenasa (LOX; EC 1.13.11.12) (Sanz y col., 1997). Dicha enzima cataliza la hidroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, siendo los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3) los sustratos principales. Esto conduce a los ácidos grasos 9- y 13-hidroperoxi, que son posteriormente metabolizados a través de al menos seis rutas (Porta y Rocha-Sosa, 2002); una de ellas supone su conversión a aldehídos, a través de la acción de la hidroperóxido liasa (HPL), y posteriormente a alcoholes y ésteres (Figura 3).

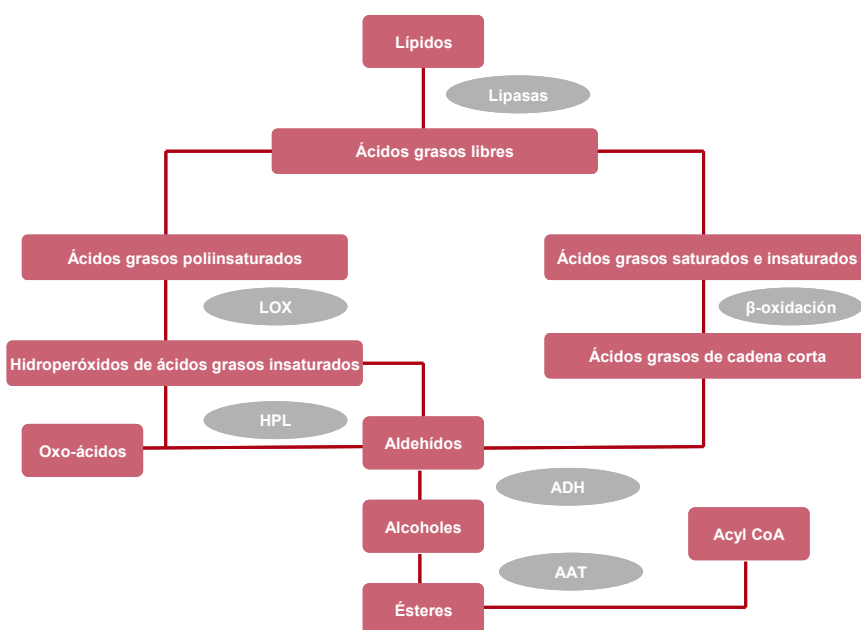


Figura 3. Síntesis de ésteres de cadena lineal en frutos (Fellman y col., 2000).

Los ácidos grasos precursores de compuestos volátiles son metabolizados mediante dos rutas principales: la β -oxidación y la ruta de la lipoxigenasa (LOX; EC 1.13.11.12). Se ha sugerido que la β -oxidación es la principal ruta metabólica en la producción del que se considera aroma primario en frutos, mientras que la ruta de la lipoxigenasa contribuye a la variabilidad entre especies y variedades. Aunque en frutos inmaduros la vía LOX está inactiva debido a la diferente localización subcelular de la enzima y el sustrato, a medida que el proceso de maduración avanza, las paredes y membranas celulares se hacen más permeables, aumentando la contribución de esta ruta

a la producción de compuestos aromáticos (Sanz y col., 1997). Ciertos estudios han revelado que, aumentando la disponibilidad de ácidos grasos junto con una mayor permeabilidad de las membranas celulares durante la maduración del fruto, se puede activar la ruta LOX y funcionar ésta como un alternativa a la β -oxidación (Pérez y Sanz, 2008).

Por otra parte, los característicos esqueletos de carbono con cadena ramificada presentes en muchos ésteres pueden derivar de aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina o valina (Wyllie y Fellman, 2000), así como de alanina y ácido aspártico (Rowan y col., 1996; Sanz y col., 1997; Dixon y Hewett, 2000). Un primer paso en su síntesis consiste en la transformación de los aminoácidos de cadena ramificada por un enzima aminotransferasa, produciéndose un α -cetoácido de cadena ramificada que, a su vez, se transforma en un alcohol de cadena ramificada o acetyl CoA. Este conjunto (acetyl CoA y alcohol) se utiliza para producir ésteres vía el enzima alcohol *o*-aciltransferasa (AAT; EC 2.3.1.84), pudiendo estar involucrado también la enzima α -ceto ácido decarboxilasa y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1) (Figura 4).

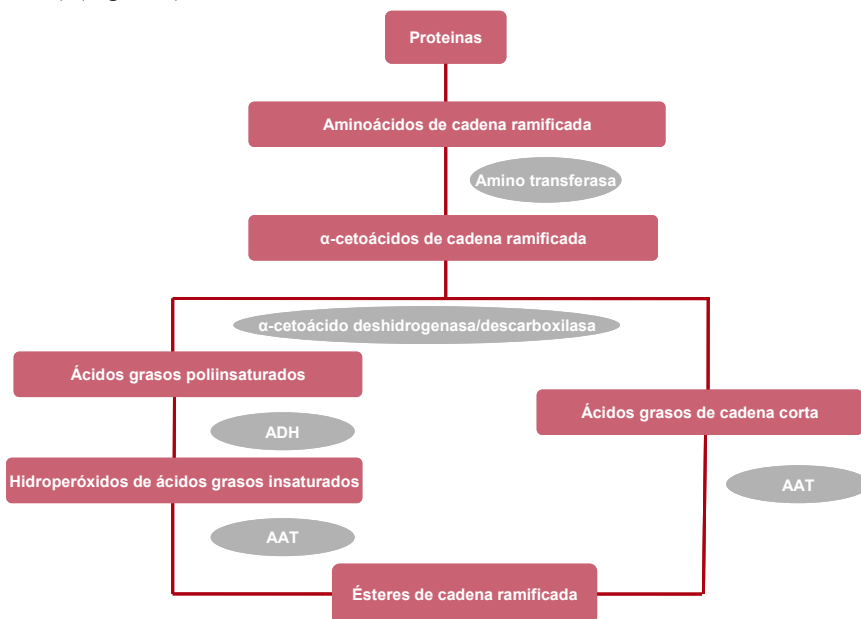


Figura 4. Síntesis de ésteres de cadena ramificada en frutos (Wyllie y Fellman, 2000).

Debido a la contribución muy significativa de los ésteres en el perfil aromático de las manzanas, la mayoría de los estudios realizados en este fruto se han centrado en el

último paso de su biosíntesis, catalizado por la enzima alcohol *o*-aciltransferasa (AAT; EC 2.3.1.84), siendo su expresión dependiente de etileno (Defilippi y col., 2005). En un estudio de la enzima AAT en la piel de 'Golden Delicious', Li y col. (2006) encontraron que la disminución en la producción de ésteres estuvo correlacionada con una menor actividad de AAT y con una disminución de la concentración de sus precursores. Varios estudios demuestran que el descenso en la capacidad de sintetizar ésteres a lo largo del periodo de permanencia a 20 °C se atribuye a una reducida disponibilidad de sustrato (el alcohol utilizado en el último eslabón de la síntesis de ésteres) más que a una baja actividad o degradación de la enzima AAT (Knee y Hatfield, 1981; Brackmann y col., 1993; Fellman y col., 1993; Fellman y Mattheis, 1995; Dixon y Hewett, 2000; Echeverría y col., 2004c; Lara y col., 2006, 2007). Esto se corrobora con el hecho de que la adición de alcoholes y aminoácidos precursores provoca un aumento en la producción de volátiles para distintas variedades de manzana (Harb y col., 1994, 2000; Rowan y col., 1996; Dixon y Hewett, 2000). Así, la composición de los ésteres finalmente emitidos por el fruto puede ser controlada por la selectividad y actividad de los enzimas implicados, y/o por la disponibilidad de sustrato para todos ellos.

Numerosos resultados demuestran la importancia de la ruta LOX en la generación del aroma en frutas como la manzana (Echeverría y col., 2004d; Defilippi y col., 2005; Lara y col., 2006, 2007), tomate (Yilmaz y col., 2002, Chen y col., 2004), plátano (Jayanty y col., 2002), fresa (Pérez y col., 1996; Leone y col., 2006) y aceituna (Pérez y col., 2003). La ruta de la lipoxigenasa ha sido reconocida como la responsable de la formación de compuestos que aportan notas 'verdes-frescas' en frutas y hortalizas (Pérez y Sanz, 2008). Además, varios trabajos han demostrado que las enzimas lipoxigenasa junto con la enzima hidroperóxido liasa (HPL EC no asignado) serían esenciales en la recuperación de la capacidad para sintetizar ésteres volátiles después del almacenaje en AC, tanto en manzanas (Lara y col., 2006, 2007; Villatoro y col., 2008) como en peras (Lara y col., 2003).

Las aplicaciones de diferentes disciplinas científicas en este campo han sido continuas hasta llegar a la aplicación reciente de la biología molecular, que ha permitido, por ejemplo, caracterizar la proteína necesaria para la biosíntesis de compuestos de tipo éster (Pérez y col., 1993) e identificar el gen que controla su síntesis (Aharoni y col., 2000).

Factores que afectan la producción de compuestos volátiles.

De forma ideal, los frutos deberían recolectarse en un estado de óptima calidad para ser consumidos. Sin embargo, la necesidad comercial de un almacenamiento y de un manejo poscosecha hace necesario disponer de unos frutos más inmaduros a la hora de la cosecha con el objetivo de extender la vida poscosecha y minimizar los daños (Song, 2007), aunque su falta de sabor sea notable (Kader, 2004).

Hay cuatro grupos de factores principales que provocan este descenso en el sabor de los productos frescos: factores genéticos, factores ambientales y prácticas culturales, la madurez en cosecha y el manejo en poscosecha (Fellman y col., 2000; Dixon y Hewett, 2000; Argenta y col., 2004; Baldwin y col., 2007). A continuación se detallan cada uno de ellos.

- Factores genéticos.

El material genético lleva inherente el sabor potencial de los frutos y, por tanto, el análisis del sabor debe formar parte de los programas de mejora. Se ha demostrado en diversos estudios que existen diferencias en la cantidad y tipo de los compuestos volátiles entre diferentes variedades tanto de frutas como de hortalizas (Kakiuchi y col., 1986; Baldwin y col., 1991a, b; Podoski y col., 1997; Dixon y Hewett, 2000; Fellman y col., 2000; Plotto y Chandler, 2006). Aún así, existen ciertas similitudes entre variedades. Una investigación realizada con 13 variedades de manzana reveló que el acetato de hexilo era el único éster presente en todas las variedades. Además, si se incluía aquellos ésteres que estaban presentes en al menos la mitad de las variedades, unos 15 ésteres tenían la misma característica en común: presentaban dos, cuatro o seis carbonos en la fracción del alcohol y/o ácido (Young y col., 2004). Por otra parte, este mismo estudio mostró que las variedades también estaban agrupadas según el color de la piel, de manera que las variedades de piel roja ('Red Delicious', 'Fuji', 'Royal Gala[®]', 'Pink Lady[®]', 'Jonagold[®]', 'IdaRed' y 'Spartan') presentaban un mayor contenido de ésteres volátiles en comparación con las de piel verde que presentaban el contenido más bajo ('Golden Delicious', 'Crispin' y 'Granny Smith'), coincidiendo con resultados obtenidos en trabajos anteriores (Fellman y col., 2000).

- Factores ambientales y prácticas culturales.

Las condiciones climáticas durante la fase pre-cosecha tienen un papel muy importante en la formación de los compuestos volátiles en manzanas. Los frutos

procedentes de lugares más fríos (según latitud y/o altitud) producen más compuestos volátiles y, además, su producción es más precoz en el periodo de cosecha (Fellman y col., 1997).

Las prácticas culturales constituyen también un factor muy importante que afecta la calidad de frutos y consecuentemente su contenido en compuestos volátiles. Una de estas prácticas es el sistema de irrigación. Un estudio mostró que, en condiciones de déficit de irrigación, el contenido de volátiles era mayor después de la conservación o cuando la manzana estaba madura, pero no en el momento de la cosecha (Mpelasoka y Behboudian, 2002). Recientes estudios con las variedades ‘Braeburn[®]’, ‘Fuji’, ‘Gala’ y ‘Pink Lady[®]’ (Caspari y col., 2004a, b; Einhorn y Caspari, 2004; Lo Bianco y col., 2008) han indicado que la técnica PRD (‘Partial rootzone drying’: Secado parcial de las raíces) permite obtener una calidad y unos rendimientos similares a aquellos obtenidos con un sistema de irrigación convencional, con una significativa reducción del consumo de agua. Especialmente, para manzanas ‘Pink Lady[®]’ y ‘Braeburn’, este déficit de irrigación también causaba un aumento en la concentración de compuestos volátiles (Lo Bianco y col., 2008; Bussakorn y col., 2001).

Otra práctica cultural a tener en cuenta es la carga en el árbol. En manzanas ‘Jonagold’, se ha observado que, reduciendo la carga del árbol, se aumentaba la producción de compuestos volátiles; los frutos de árboles con menor ratio fruto/hoja producían más acetato de butilo y acetato de hexilo que los de árboles con una carga más elevada (Hewett y col., 1999). En cuanto a la fertilización, se ha demostrado en fresas que altos niveles de nitrógeno (más de 3 mmol/L) daban lugar a una acumulación de ésteres, carbohidratos solubles y amino-ácidos, pero se observó un aumento en la acidez y un retraso en la maduración cuando la concentración era superior a 6 mmol/L (Ojeda-Real y col., 2009). Otro estudio en tomate también mostró que altas concentraciones de nitrógeno afectaban negativamente al aroma del fruto (Wang y col., 2007).

Además, también hay que tener en cuenta que frutos de árboles jóvenes son altamente susceptibles a desórdenes (Bramlage, 1993), mientras que frutos de árboles más viejos tienen una calidad muy débil (Smith, 2003). También, el rendimiento y la calidad del fruto han mostrado una fuerte dependencia de las técnicas de poda y aclareo, ya que distribuciones más amplias pueden afectar a la floración, el calibre del fruto, el color y otros factores de calidad (Hampson y col., 2002).

- Estado de madurez.

El estado de madurez del fruto en el momento de la recolección es un factor crítico que afecta a la maduración y al desarrollo de los compuestos volátiles a lo largo del periodo poscosecha (Fellman y col., 1993, 2000, 2003; Herregods y Goffings, 1994; Mattheis y Fellman, 1999; Echeverría y col., 2004d). La maduración de un fruto es un proceso caracterizado por una serie de cambios fisiológicos y estructurales. Estos cambios incluyen un aumento en la respiración y la producción de etileno, el ablandamiento del fruto, la hidrólisis del almidón y el incremento de azúcares, la degradación de la clorofila y síntesis de otros pigmentos, cambios en la membrana celular, síntesis de proteínas específicas y síntesis de compuestos volátiles (Mehinagic y col., 2006). Frutos recolectados inmaduros producen menos volátiles y pierden la capacidad de reactivación de su metabolismo a salida del almacenamiento, especialmente tras largos periodos bajo condiciones de AC o ULO (Mattheis y col., 1991; Song y Bangerth, 1996; Fellmann y col., 2003). Por tanto, un estado de madurez adecuado permitirá que, después del periodo de conservación, el fruto reactive todos sus procesos metabólicos (Fellman y col., 1995).

El etileno es el responsable de la activación de ciertas enzimas implicadas en la biosíntesis de aromas (Song y Bangerth, 1996; Fan y col., 1998; Defilippi y col., 2004; Mattheis y col., 2005). A medida que la producción de etileno y la tasa respiratoria aumentan, la cantidad de compuestos volátiles emitidos también es mayor, observándose que algunos compuestos se encuentran en niveles máximos justo después del pico climatérico (Mattheis y col., 1991; Fellman y Mattheis, 1995; Song y Bangerth, 1996; Fellman y col., 2000). Tratamientos que inhiben la maduración inhibiendo la biosíntesis de etileno (AVG, aminovinilglicina) o su acción (1-MCP, 1-metilciclopropano) reducen la formación de los compuestos volátiles en manzana (Fan y col., 1999; Lurie y col., 2002; Bai y col., 2004; Defilippi y col., 2004; Watkins, 2006). Después de estos tratamientos, la producción de volátiles se puede recuperar parcialmente durante el almacenamiento pero nunca alcanza los niveles óptimos que se observan en frutos maduros (Ferenczi y col., 2006).

El estado de madurez no sólo influye en la producción de volátiles en cosecha sino que también determina la regeneración de los volátiles después del almacenamiento en AC. A medida que la madurez en cosecha es mayor, disminuye el tiempo necesario para regenerar los compuestos volátiles a la salida del almacenamiento en AC

(Fellmann y col., 2003; Ferrandino y col., 2007). Un estudio realizado en las variedades 'Fuji' y 'Golden Delicious', en el que se recolectaron frutos en tres fechas de cosecha distintas (siendo la intermedia la comercial) demostró que la cantidad total de compuestos volátiles aumentaba durante la maduración para ambas variedades, lo que está relacionado con un aumento de la cantidad de diferentes sustratos (como aminoácidos, ácidos orgánicos, alcoholes y aldehídos). Para 'Golden Delicious', el mayor aumento se produjo en el caso de los compuestos acetato de butilo, acetato de 2-metilbutilo, (Z)-Hexen-3-ol, butanoato de 2-metilbutilo y hexanol, para la cosecha más tardía (Mehinagic y col., 2006); mientras que, para la variedad 'Fuji', el mayor aumento tuvo lugar en el momento de la cosecha comercial, y sobre todo en el caso del éster acetato de 2-metilbutilo.

- Manejo en poscosecha.

La apariencia, textura y sabor, incluyendo los niveles de los compuestos volátiles, están altamente influenciados por las condiciones en poscosecha como el método de enfriamiento, la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa, la composición de la atmósfera, el tipo de embalaje y las condiciones durante la distribución comercial (Lee y Kader, 2000; Brecht y col., 2004; Brovelli, 2006; Jones y col., 2006; Lester, 2006). Si los frutos son manejados en condiciones impropias, una buena parte de estos atributos se verán afectados negativamente (Nunes, 2008).

Uno de los factores más relacionados con la pérdida de aroma en los frutos es su conservación en AC. Aunque la AC puede alargar la vida útil de los frutos, especialmente en manzanas, que pueden ser almacenadas hasta un año (Watkins y col., 2004), se ha demostrado en diferentes estudios que dicha tecnología reduce de forma muy marcada la producción total de compuestos volátiles en comparación con el almacenamiento en frío normal (Yahia y col., 1990; Bangerth y col., 1998; Fellman y col., 2000). La magnitud de la respuesta es dependiente de diferentes factores como la madurez en cosecha (Yahia y col., 1990; Hansen y col., 1992), las concentraciones de O₂ y CO₂ y el periodo de frigoconservación (Streif y Bangerth, 1988). También existe una considerable variación entre campañas (López y col., 1998a; Echeverría y col., 2004b).

La composición de la atmósfera de almacenamiento afecta la cantidad de volátiles (Streif y Bangerth, 1988), así como el tipo de ésteres producidos (Fellman y col., 1993;

Brackman y col., 1993). Las atmósferas con bajo nivel de oxígeno disminuyen no sólo el contenido de algunos ésteres, sino también la actividad de las enzimas responsables de la biosíntesis de estos ésteres (Fellman y col., 1993). Cuanto más baja es la concentración de O₂ y/o más alta es la concentración de CO₂, y más larga es la conservación en atmósfera controlada, mayor es la reducción en la emisión de los compuestos volátiles (Yahia y col., 1990). Pero, se ha observado que si antes de finalizar el período de almacenamiento se aumentaba el nivel de O₂ o se transferían los frutos a condiciones ambientales normales, se provocaba una mejor regeneración del aroma de la manzana (Lau, 1998; Streif y Bangerth, 1988; Fellman y col., 1993; Mattheis y col., 1995; Plotto y col., 1999; Mattheis y Fellman, 2000; Fellman y col., 2003; Young y col., 2004), mejorándose ello aún más con la permanencia posterior en condiciones ambientales a 20 °C (López y col., 1998a).

Métodos de análisis

Los volátiles producidos por las manzanas están presentes en cantidades muy pequeñas pero, aun así, pueden ser detectados por el olfato humano (Goff y Klee, 2006). Los métodos más comúnmente utilizados para extraer y aislar los compuestos han sido la destilación y la extracción mediante solventes (Terashini y Kint, 1993). Desafortunadamente, estas técnicas pueden modificar el perfil aromático, tanto cualitativa como cuantitativamente (Schamp y Dirinck, 1982).

Debido a la baja concentración de los compuestos volátiles en los frutos, que incluso puede ser inferior al límite de detección de muchos instrumentos, diferentes técnicas analíticas han sido desarrolladas para poder concentrar los volátiles antes del análisis. Los compuestos volátiles pueden ser recogidos en materiales adsorbentes durante un periodo de tiempo en un ambiente cerrado llamado 'espacio estático' o pueden ser purgados hacia métodos con trampa. Estos volátiles concentrados pueden, entonces, ser transferidos a instrumentos analíticos mediante calor o solventes (Tholl y col., 2006). Tecnologías analíticas utilizando trampas químicas adsorbentes o micro-extracción en fase sólida (SPME), en combinación con cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS) se han utilizado ampliamente para caracterizar cambios en volátiles (Tholl y col., 2006).

La técnica del espacio de cabeza dinámico se ha aplicado por parte de muchos investigadores para aislar los compuestos volátiles en manzana (Mattheis y col., 1991; Song y Bangerth, 1996; López y col., 2007). Esta técnica ofrece una buena sensibilidad pero requiere equipamiento especial para adsorber los volátiles y transferirlos al puerto de inyección de GC o GC-MS, utilizándose desorción por calor o dilución mediante solventes.

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) fue aplicada al análisis del aroma de los alimentos por Yang y Peppard (1994). En el caso particular de manzanas fue aplicada inicialmente por Matich y col. (1996) y por Song y col. (1997). Si se compara con la técnica del espacio de cabeza dinámico, SPME ofrece una recuperación similar de los aromas (Song y col., 1998). Aunque SPME puede sólo ofrecer un análisis semi-cuantitativo de los volátiles, debido a la matriz y la competencia por el espacio en la fibra adsorbente, se ha convertido en una de las técnicas más ampliamente utilizadas para el análisis de la composición volátil de los frutos, dada su rapidez, sensibilidad (ppbv, partes por billón en volumen) y la no necesidad de solventes para la extracción. Un inconveniente de SPME es que las muestras sólo pueden analizarse una vez, mientras que con el espacio de cabeza dinámico las muestras (disueltas en disolventes) se pueden analizar múltiples veces (Song, 2007).

El principal instrumento utilizado para estudiar el aroma es el cromatógrafo de gases (GC). Algunos avances se han realizado en la tecnología 'inlet' (Skoog y col., 1997). La técnica de cromatografía rápida, 'Fast GC' (Brichford y Parry, 1997), permite terminar un análisis en menos tiempo sin pérdida de resolución; la cromatografía en dos dimensiones, '2-dimensional GC' (GC-GC), es una técnica que permite 'cortes' de un primer GC para ser inyectados a un segundo GC, para hacer separaciones en otro tipo de columna (por ejemplo, no-polar a polar). El detector de llama fotométrico (FPD) aumenta la sensibilidad con respecto al detector por ionización de llama (FID) en, aproximadamente, dos órdenes de magnitud, y permite la selectividad para compuestos sulfuro y fósforo en el mismo análisis (Amirav y Hongwu, 1995). La técnica de cromatografía de gases-olfactometría (GCO) es ampliamente utilizada en la investigación sobre el aroma para determinar la contribución de los compuestos individuales al aroma. El análisis de volátiles mediante GC-O ha identificado 24 compuestos volátiles en diferentes variedades de manzana, en el estado de óptima madurez de los frutos. Estos resultados revelan que los indicadores de madurez

tradicionales como el color de la epidermis, diámetro, contenido de sólidos solubles y acidez podrían no ser suficiente para determinar la calidad sensorial óptima de los frutos (Mehinagic y col., 2006).

Otra técnica muy novedosa es el análisis de los compuestos volátiles mediante la utilización de narices electrónicas (E-nose); éstas pueden ser acopladas al espectrómetro de masas (MSE-nose). Esta tecnología puede ofrecer alternativas más rápidas a la clásica medida por GC-MS. La nariz electrónica (e-nose) discrimina muestras basándose en las respuestas de un conjunto de sensores que son sensibles a los compuestos volátiles (Shaw y col., 2000; Goodner y col., 2000). También, otros instrumentos llamados ‘lenguas electrónicas’ permiten discriminar muestras basándose en las respuestas de un conjunto de sensores moldeados para detectar los gustos de dulce, salado, ácido, amargo y umami (Tan y col., 2001). Otros desarrollos en el análisis y detección en tiempo real de volátiles han llevado al uso de las reacciones de transferencia de protones (PTR-MS) en volátiles (Tholl y col., 2006). Sin embargo, su aplicación no se ha probado en manzanas. Un mayor desarrollo en las tecnologías analíticas ofrecerá un aumento en la capacidad del análisis de volátiles y en la medida de la calidad del fruto.

2.3.3. Calidad sensorial.

La calidad sensorial de una manzana corresponde a la calidad percibida por los sentidos del gusto, olfato, vista, tacto y oído en el momento de consumo, y que se expresa en forma de diversos atributos sensoriales. La evaluación sensorial es necesaria para analizar esta calidad en los frutos y especialmente, para valorar la percepción del aroma en los mismos (Baldwin y col., 2007). En el caso de manzanas, diversos estudios han demostrado que los consumidores eligen dichas frutas por motivos de salud, por su sabor y por su textura (Harker y col, 2002; Péneau y col., 2006). La investigación llevada a cabo para analizar y comprender las respuestas de los consumidores a la calidad del fruto (manzanas en particular), ha sido enfocada desde dos perspectivas diferentes. Una visión económica es necesaria para los productores de manzana, para poder ser éstos competitivos en su producción y venta (Ricks y col., 2000; Harker y col., 2003). Otra perspectiva nutricional se refiere al esfuerzo para aumentar el consumo de fruta, sobre todo en niños y adolescentes. Desde estas dos perspectivas, el estudio de

la aceptación y preferencias por parte del consumidor es de primordial importancia (Tomala y col., 2009).

Atributos sensoriales.

Los atributos sensoriales pueden agruparse en tres categorías principales: sabor, textura y apariencia. De una manera más específica, en manzanas se han descrito los siguientes atributos sensoriales: aspecto, consistencia, crocancia, harinosidad, jugosidad, dulzura, acidez, aroma y sabor (Lespinasse y col., 2002). En el caso del sabor, este atributo es el resultado de una compleja mezcla de sensaciones de gustos y olores del fruto (Beaudry, 2000). Los atributos sensoriales (descriptores) de un determinado producto deben ser descritos (tanto cualitativa como cuantitativamente) por un panel de jueces entrenados. En la evaluación del aspecto, estos jueces tienen en cuenta la intensidad y brillo del color, el olor viene determinado por el perfume percibido a través de la nariz, la percepción global del aroma (percibida vía retronasal) se consigue un vez el producto ha sido introducido y masticado en la boca, los gustos (dulce, ácido, amargo) son percibidos preferentemente por las papilas gustativas de la lengua, y los aspectos relacionados con la textura (como firmeza, crocancia, jugosidad y harinosidad) son evaluados en el momento de masticar el producto en la boca.

La textura en manzanas es una de las cualidades más importantes que influyen en la aceptabilidad de los frutos (Stow, 1995; Harker y col., 2008). Los cambios en esta característica dependen principalmente de la variedad, ya que se ha demostrado que la textura para 'Golden Delicious' se veía más afectada después del almacenamiento que en la variedad 'Fuji'. Diversos factores que influyen en el metabolismo enzimático del fruto deben tenerse en cuenta para entender el mecanismo de ablandamiento de los mismos (Billy y col., 2008). A nivel sensorial, Harker y col. (2006) demostraron que el consumidor es capaz de detectar diferencias en firmeza para manzanas que difieren en más de 5 N (medida mediante técnicas instrumentales).

Aunque tradicionalmente las empresas del sector siguen utilizando la medida del contenido de sólidos solubles y la acidez, así como el calibre y aspecto externo, como únicos parámetros en el control de calidad de fruta, muchas veces estas medidas no se correlacionan bien con la percepción que los consumidores tienen de esta fruta. Así, por

ejemplo, una manzana con una firmeza de 80 N puede ser considerada como una manzana firme y crujiente aunque realmente sólo se trate de una manzana recolectada demasiado inmadura, y por tanto con un claro déficit de calidad gustativa. Cabe destacar el aumento en los últimos años de la investigación en ciencia sensorial que ha permitido una mejor comprensión de las causas que motivan la aceptabilidad de los frutos (Alavoine y col., 1990; von Alvensleben y Meier, 1990; Crisosto y col., 2003; Harker y col., 2003; Jaeger y col., 2005). Entender los atributos de calidad que son importantes para los consumidores es muy útil también para la investigación en los programas de mejora genética, para mejorar la calidad y la aceptabilidad de los frutos obtenidos, y así, orientar la producción que ha de llegar al mercado (Wismer y col., 2005).

Métodos de análisis sensorial.

La evaluación sensorial de la fruta tiene como objetivo, por un lado, identificar y valorar las características organolépticas de la fruta, y por otro, expresar la satisfacción percibida por los consumidores después de su degustación. Es, por tanto, una herramienta muy interesante para evaluar la calidad del producto, aspecto básico para optimizar su producción, manejo, almacenamiento y comercialización. Los métodos de análisis sensorial están clasificados en diferentes tipos dependiendo del tipo de pregunta que se responde. Tipo 1: ¿Hay alguna diferencia entre dos productos?. Tipo 2: Los productos son diferentes, pero ¿cómo es la magnitud de esa diferencia y cómo puede ser calificada o cuantificada? y Tipo 3: ¿Preferiría el consumidor un producto por encima de otro? (Baldwin y col., 2007). Las dos primeras cuestiones no enfocan la calidad desde un punto de vista emocional (preferencia, aceptación) mientras que la tercera cuestión sí (Meilgaard y col., 1999; Carpenter y col., 2000; Lawless y Heymann, 1999).

Las pruebas hedónicas se usan para evaluar la aceptación o rechazo de un producto determinado. Aunque su realización pueda parecer rutinaria, el planteamiento es muy complejo y debe hacerse de manera rigurosa a fin de obtener datos significativos (Sancho y col., 1999). En el momento en que se plantea una prueba hedónica se debe tener en cuenta una serie de aspectos importantes como precisar de forma inequívoca la naturaleza de la cuestión a resolver y analizar el comportamiento y tipo de consumo del producto estudiado; usar sólo grupos bien definidos de sujetos no entrenados; plantear preguntas hedónicas sencillas o pedir comparaciones fáciles, y finalmente tener conciencia de las limitaciones en cuanto a la validez de los resultados en función de la

situación artificial impuesta a los individuos (Sancho y col. 1999). Estas pruebas presentan una gran variabilidad en los resultados y su interpretación, ya que se trata de apreciaciones totalmente subjetivas (Anzaldúa-Morales y Brennan, 1984).

Los análisis descriptivos se han utilizado para conocer las preferencias de los consumidores. Los consumidores pueden expresar una opinión y decir que prefieren un producto más que otro, pero no necesariamente tienen que saber porque prefieren uno más que el otro. El análisis descriptivo sensorial mediante paneles entrenados, por otra parte, explicaría las diferencias entre los productos utilizando palabras específicas y escalas. Ambos paneles, descriptivos y de consumidores, han sido utilizados para evaluar la calidad de nuevas selecciones de variedades de manzana (Hampson y col., 2000). Resultados de paneles de consumidores y perfiles descriptivos pueden, por tanto, ser correlacionados (Jaeger y col., 1998). Existen investigaciones que se han planteado correlacionar las medidas sensoriales y las medidas instrumentales de los parámetros de calidad en frutos (Abbott y col., 1992, 1995; Baldwin y col., 1998, 2004; Karlsen y col., 1999; Lavilla y col., 1999; Harker y col., 2002; Echeverría y col., 2004a, 2004c). Al intentar desarrollar modelos de aceptación sensorial basados en medidas instrumentales (como la producción de compuestos aromáticos determinados por cromatografía gaseosa) no se recomienda utilizar los métodos tradicionales de regresión lineal múltiple (por problemas de colinearidad entre variables); por ello, las investigaciones recientes han utilizado procedimientos multivariantes como la regresión mediante análisis de componentes principales (PCA) y la regresión parcial de mínimos cuadrados (PLRS) (Martens y Naess, 1989; Brockhoff y col., 1993; Lavilla y col., 1999). En el caso de la variedad 'Fuji', Echeverría y col. (2004e) encontraron una buena correlación entre la acidez sensorial determinada mediante un panel de consumidores y la acidez titulable determinada instrumentalmente. Por otra parte, cuando se relacionaron los datos de aceptabilidad sensorial con diversas medidas instrumentales (parámetros físico-químicos y compuestos aromáticos), se concluyó que algunos compuestos aromáticos específicos explicarían diferencias en la aceptabilidad de las muestras (Echeverría et al., 2004a).

2.4. Tecnología de conservación: atmósferas controladas con muy bajo nivel de oxígeno.

En el almacenamiento comercial de manzanas, la tecnología de atmósfera controlada (AC) se utiliza ampliamente para disminuir la incidencia de desórdenes fisiológicos durante largos periodos de almacenamiento y para mantener la calidad del fruto; en particular, se consigue disminuir las pérdidas de firmeza y acidez, y mantener el color verde de la epidermis (Johnson y Ridout, 2000; Watkins y col., 2004).

La tecnología AC consiste en una modificación de la atmósfera presente en las cámaras de almacenamiento de frutos, disminuyendo la concentración de oxígeno y aumentando la concentración de dióxido de carbono en comparación con el aire ambiente. Esto permite, conjuntamente con la refrigeración, alargar el período de almacenamiento, así como mantener la calidad del fruto en la mayoría de variedades de manzana y pera. El éxito de esta tecnología es evidente si comprobamos la gran difusión que presenta en la mayoría de centrales frutícolas de las principales zonas productoras en el mundo. Así, por ejemplo, en el contexto de las central leridanas, de un volumen total de cámaras alrededor de dos millones de metros cúbicos, casi el 70 % corresponde a cámaras de atmósfera controlada. Para obtener claros beneficios en la conservación de manzanas y peras, la concentración de oxígeno aplicada debe ser inferior al 3 %. De todas formas, estudios llevados a cabo en los últimos años en diferentes centros de investigación del mundo han permitido concluir que la calidad de los frutos se mantiene mejor y su período de conservación puede alargarse, si se utilizan concentraciones de oxígeno del 2 % o incluso más bajas, alrededor del 1 %. Estas técnicas se llaman LO ('Low Oxygen', entre 1,8-2% de oxígeno) y ULO ('Ultra Low Oxygen', entre 1-1,2%).

Sin embargo, de las investigaciones y de la experiencia práctica en el sector se ha visto, claramente, que si bien con las atmósferas ULO se consigue que las manzanas presenten a la salida de cámara unos mayores valores de firmeza, de acidez y sólidos solubles, y una más alta coloración verde (provocado por un retraso en los procesos bioquímicos que tienen lugar en la maduración), hay una reducción de la producción total y de la emisión de ciertos compuestos aromáticos en los frutos (Hansen y col., 1992; Brackmann y col., 1993; Mattheis y col., 1991, 1995, 2005; Plotto y col., 1999, 2000; Dixon y Hewett, 2000; López y col., 1998a, 2000; Fellman y col., 2000, 2003; Echeverría y col., 2004a, b, e).

Esta supresión de los volátiles inducida por las condiciones ULO depende particularmente de la composición de la atmósfera y del período de almacenamiento; los bajos niveles de oxígeno y altos de dióxido de carbono, así como largos periodos de frigoconservación resultan en una mayor reducción (Fellman y col., 2000). Además, la madurez del fruto en el momento de cosecha es otro factor importante que afecta a esta respuesta de los frutos y, por tanto, condiciona el desarrollo del sabor en los mismos (Fellman y col., 2003; Echeverría y col., 2004b).

Un estudio realizado por Kupferman (2003) destacó que dentro de las cinco variedades más cultivadas en Europa y Estados Unidos se encuentran ‘Fuji’ y ‘Golden Delicious’ (esta última es la más cultivada en Europa). Los valores recomendados de oxígeno y dióxido de carbono son diferentes según distintos autores a causa de las distintas zonas de cultivo y los diferentes estados de madurez considerados en cada caso (Thompson, 1998). En la Tabla 2 se muestran los niveles óptimos de dichos gases recomendados para ambas variedades en distintos lugares del mundo.

Tabla 2. Niveles óptimos de O₂ y CO₂ para el almacenamiento en atmósfera controlada de manzanas ‘Fuji’ y ‘Golden Delicious’ (Kupferman, 2003).

Variedad	País	Óptimo O ₂ (%)	Óptimo CO ₂ (%)	Óptimo temp (°C)	Periodo conservación (meses)
Fuji	EEUU	2,0	0,5	1	12
	España ⁽¹⁾	1,0	1,0	1	7
Golden Delicious	Bélgica	2,5	1	0,5	9
	Canada	1,5	1,5	0-0,5	10
	España ⁽²⁾	2	2	1	5
	Italia	1	2	1-2	8-9
	Holanda	1-1,2	4	1	8
	Sud Africa	1,5	2,5	-0,5	9
	USA (WA)	2	1,5	0-1	9

⁽¹⁾ ⁽²⁾: Los valores en España se han obtenido de Echeverría y col. (2002) y López y col. (2000), respectivamente; WA. Washington state

A continuación se detallan los efectos más específicos de la tecnología AC y concretamente de la tecnología objeto de estudio en esta tesis, ULO, en la calidad estándar, aromática y organoléptica de manzanas.

2.4.1. Efecto sobre la calidad estándar.

El efecto de la tecnología ULO sobre los parámetros de calidad estándar de manzanas se ha estudiado en diferentes variedades, sometidas a diferentes periodos de almacenamiento y periodos de vida comercial. Cabe destacar una gran disparidad en los resultados obtenidos, influenciados por diferentes factores como la variedad, atmósfera, madurez del fruto, año y zona de cultivo, entre otros. Ahora bien, en general, se logran unos claros beneficios, que se centran principalmente en una mayor duración del período de almacenamiento, un mejor mantenimiento de la calidad del fruto (firmeza y acidez) y una reducción de la incidencia de ciertos desórdenes fisiológicos (Brackmann y col., 1994; Graell y col., 1997; López y col., 2000). Aun así, los valores recomendados de oxígeno y dióxido de carbono difieren entre autores, probablemente debido a la diferencia en las zonas de cultivo y los estados de madurez de los frutos en el momento de cosecha.

En general, y para largos períodos de almacenamiento en condiciones de atmósfera controlada, no se producen pérdidas muy marcadas en los parámetros físico-químicos de calidad en manzanas 'Fuji', tal como se ha observado en varios estudios (Echeverría y col., 2002; Echeverría y col., 2004e). De todos modos, un estudio realizado en condiciones de atmósfera LO (2% O₂:2% CO₂) y ULO (1% O₂:1% CO₂, 1% O₂:3% CO₂) demostró que la atmósfera 1% O₂:1% CO₂ era la mejor para mantener los parámetros físico-químicos en manzanas 'Fuji' y para conseguir la mayor aceptación por parte del consumidor, tras largos periodos de almacenamiento (Echeverría y col., 2004e). Además, los frutos almacenados en estas condiciones también presentaban niveles más altos de sólidos solubles y acidez (Echeverría y col., 2004a). Otros autores también han confirmado estos efectos beneficiosos de las atmósferas con bajo nivel de oxígeno en otras variedades (Brackmann y col., 1995; Fan y col., 1997; Drake y Elfving, 1999; Baldwin y col., 2000).

En general, el efecto perjudicial del CO₂ en las manzanas 'Fuji' (daños en forma de pardeamientos en pulpa), es el principal motivo para recomendar concentraciones de este gas inferiores al 1% durante el almacenamiento. La susceptibilidad de los frutos a estos daños incrementa con altos valores de este gas en la atmósfera (Fan y col., 1997) y con estados de madurez más avanzados (Volz y col., 1998). La aparición de este desorden limita el potencial de almacenamiento de esta variedad (Lee y Choi, 1997; Chung y col., 2005). Se ha demostrado que retrasar la puesta a régimen de la atmósfera

controlada tras la carga inicial de la cámara frigorífica, reduce la incidencia de daños por CO₂, pero los frutos presentan una pérdida mayor de otros atributos de calidad que en el caso de la puesta inmediata en condiciones de AC, especialmente en variedades como 'Fuji' (Lee y Choi., 1997; Argenta y col., 2000) y 'Braeburn' (Elgar y col., 1998). Un periodo de 2 meses en condiciones 1% O₂:1% CO₂ seguido de un período de 8 meses en condiciones 1% O₂:3% CO₂, parece una medida efectiva de evitar daños por oscurecimiento interno y mantener la firmeza, acidez y el color verde en manzanas 'Fuji' (Chung y col., 2005).

El escaldado superficial es otro desorden importante que aparece durante el alargamiento del almacenamiento en ciertas variedades de manzana. Las manzanas cultivadas en la zona de Lleida y Aragón tienen una alta sensibilidad a este desorden debido al clima cálido y seco durante la época pre-cosecha. La aplicación de atmósferas controladas ULO que fija unos niveles de oxígeno entre 0,8-1,2% permite mantener la calidad del fruto y reducir la incidencia de este desorden fisiológico (Brackman y col., 1994; Graell y col., 1997; López y col., 2000; Echeverría y col., 2002).

En las manzanas, el etileno es clave en la maduración (Schaffer y col., 2007). La capacidad para reducir la biosíntesis de etileno y su acción puede ser un método comercial para reducir el ablandamiento acelerado. Por lo tanto, sería deseable poder inhibir únicamente aquellos procesos dependientes de etileno que afectan el ablandamiento (Johnston y col., 2002). En este sentido, temperaturas bajas y niveles bajos de oxígeno (0,5-3%) y/o altos de CO₂ (3%) pueden reducir la producción de etileno y la consecuente pérdida de calidad (Gorney y Kader, 1996; Fan y col., 1999). Por otro lado, la aplicación en poscosecha del 1-metilciclopropeno (1-MCP, un inhibidor de la acción del etileno) ha mejorado muchas características fisiológicas y de calidad de los frutos en diferentes variedades de manzana, puesto que permite reducir la producción de etileno y la respiración del fruto (Weis y Bramlage 2002; Saftner y col., 2003), permitiendo una mayor retención de su firmeza y acidez (Johnson, 2003; Saftner y col., 2003; Zanella 2003), y una menor incidencia del escaldado superficial, de la apariencia grasa en la piel y de diferentes desórdenes relacionados con el frío (Fan y col., 1999; DeEll y col., 2002; Bai y col., 2005). Watkins y col. (2000) demostraron que los efectos de 1-MCP eran mayores en AC que en frío normal, para manzanas 'McIntosh', 'Empire', 'Delicious' y 'Law Rome', lo que también fue observado por DeLong y col. (2004) en manzanas 'Cortland' y 'McIntosh'. Sin embargo, en manzanas

'Granny Smith', el tratamiento con 1-MCP permitió mantener una firmeza más elevada y un mejor control del escaldado con independencia de si los frutos permanecían en AC o en FN sin aplicación de 1-MCP (Zanella, 2003). Cabe señalar, además, que en frutos tratados con 1-MCP y posteriormente almacenados en AC se pueden propiciar daños por CO₂ (Zanella, 2003).

2.4.2. Efecto sobre la calidad aromática.

Se conoce que las atmósferas controladas (especialmente en el caso de atmósferas con bajo nivel de oxígeno) provocan, en general, una reducción en la producción total de compuestos volátiles en manzanas (Yahia, 1990; Brackmann y col., 1993; Mattheis y col., 1995; Fellman y col., 2000, 2003; López y col., 2000; Plotto y col., 2000; Aaby y col., 2002; Argenta y col., 2004; Echeverría y col., 2004b). En general, a excepción del etanol (Pesis, 2005), las condiciones de anoxia reducen fuertemente la síntesis de compuestos volátiles (Rudell y col., 2002). Pero parece ser que, si antes de finalizar el período de almacenamiento se aumenta el nivel de oxígeno o se transfiere el fruto a condiciones de atmósfera normal, se puede conseguir una regeneración de los compuestos aromáticos (Lau, 1998; Streif y Bangerth, 1988; Fellman y col., 1993; Mattheis y col., 1995; Lavilla y col., 1999; Plotto y col., 1999, 2000; Mattheis y Fellman, 2000; Fellman y col., 2003; Young y col., 2004). Especialmente, los ésteres de bajo peso molecular aumentan más rápidamente después de AC que los ésteres de más alto peso molecular (Young y col., 2004). Esta recuperación de la capacidad de biosíntesis de compuestos volátiles tras el almacenamiento en AC es más pronunciada en el caso del metabolismo de los aminoácidos que el de los ácidos grasos (Brackmann y col., 1993). La acción de las atmósferas controladas sobre la producción de compuestos volátiles depende de la composición de la atmósfera, la duración del almacenamiento (Fellman y col., 1993), la temperatura del almacenamiento (Chen y col., 1989), la variedad (Yahia y col., 1990; Fellman y col., 1993) y el estado de madurez del fruto en el momento de la recolección (Brackmann y col., 1994). Esta disminución es causada en cierta medida por una reducción parcial de los procesos oxidativos necesarios para la producción de sustratos; este tipo de acción ha sido señalada en manzanas 'Fuji' y en peras 'Doyenne du Comice' como consecuencia de un almacenamiento en atmósfera controlada, dando lugar a un desarrollo anormal después

de transferir el fruto desde unas condiciones de hipoxia a unas condiciones de atmósfera normal (Lara y col., 2003, 2007).

En este sentido, la influencia del almacenamiento en atmósferas controladas sobre los compuestos volátiles se manifiesta de manera diferente según la procedencia de estos compuestos. En general, estas atmósferas producen una disminución en la producción de acetatos de cadena lineal, que proceden del metabolismo de los ácidos grasos (Fellman y col., 1993); las rutas de formación de estos compuestos son dependientes de oxígeno y, por tanto, se verán afectadas por los niveles bajos de este gas en la atmósfera. En cambio, los ésteres de cadena ramificada que proceden del metabolismo de los aminoácidos no resultan afectados negativamente por las atmósferas controladas (López y col., 1998a). Los precursores de éstos son producidos en las células por el ciclo de los ácidos tricarbónicos, que, a su vez, es inhibido por altas concentraciones de dióxido de carbono (Frenkel y Patterson, 1973). Estas diferencias se han descrito también en otros trabajos (Lara y col., 2006, 2007). En el caso de manzanas de la variedad 'Rome', los frutos producían más acetato de 2-metilbutilo después del almacenamiento en AC que tras el almacenamiento en FN (Fellman y col., 1993). También, la exposición al 1-MCP produce diferentes efectos en los dos grupos de ésteres, siendo los ésteres ramificados de cadena corta los más afectados (Raffo y col., 2009). Esto confirma trabajos anteriores en manzanas 'Gala' (Mattheis y col., 2005), en los que se corrobora la idea de que las dos rutas biosintéticas responden diferente a la inhibición de la acción del etileno. Además, este último trabajo también demostró que la aplicación de 1-MCP complementada con un almacenamiento en AC resulta en una mayor disminución en la producción de la mayoría de compuestos volátiles, indicando así que la tecnología AC puede prolongar el impacto del 1-MCP. La posterior exposición de los frutos a etileno causaba un aumento en la producción de ésteres y alcoholes de los frutos almacenados en AC independientemente de si tenían o no tratamiento con 1-MCP. Un estudio llevado a cabo en manzanas 'Pinova' reveló que los frutos almacenados en atmósfera controlada dinámica (DCA) presentaban una menor producción total de volátiles que aquellos almacenados en atmósfera ULO pero, aún así, esta producción era más elevada que en el caso de los frutos sometidos al tratamiento combinado 1-MCP + ULO (Raffo y col., 2009).

Por otra parte, cuando se aplicaban niveles mayores de dióxido de carbono en la atmósfera de almacenamiento, menor era la producción de compuestos aromáticos

(Streif y Bangerth, 1988). Además, si se aplicaba simultáneamente unos niveles muy bajos de oxígeno y unos niveles altos de dióxido de carbono, el efecto supresivo de las atmósferas controladas es mucho mayor que el obtenido por separado (Brackmann y col., 1993). Sin embargo, este efecto sumatorio de ambas condiciones no responde a una simple relación lineal o sinérgica; así, la atmósfera controlada con una alta concentración de dióxido de carbono tiene un mayor efecto negativo sobre la producción aromática que la atmósfera controlada con un contenido bajo de oxígeno (Streif y Bangerth, 1988).

Otros estudios (Knee y Hatfield, 1981; Brackmann y col., 1993; Fellman y col., 1995; Echeverría y col., 2004d; Lara y col., 2006; 2007) han demostrado este efecto negativo de la AC sobre los principales ésteres así como también sobre los alcoholes precursores. La disminución en la capacidad para sintetizar ésteres durante el periodo de vida comercial posterior al almacenamiento se atribuye a una reducción en la disponibilidad de sustratos en lugar de a una baja actividad de la enzima AAT, ya que el tratamiento del fruto entero o secciones de tejidos con vapores de aldehídos, alcoholes y ácidos carboxílicos mejoraba significativamente la concentración de los correspondientes ésteres (Kollmansberger, 1992; Harb, 1994; Dixon y Hewett, 2000). Por otra parte, otros estudios han demostrado claramente la importancia general del nivel de alcoholes como un factor limitante en la producción de ésteres volátiles (Berger y Drawet, 1984; Defilippi y col., 2005).

Si bien los compuestos volátiles son importantes para la calidad de los frutos, puede suceder que otros parámetros de calidad tengan una influencia primordial sobre la aceptación de los mismos. Así, Echeverría y col. (2004b) apuntaron que si una manzana ha sido almacenada por un periodo corto de tiempo y aún es capaz de generar un balance apropiado de volátiles, será aceptada aunque presente niveles bajos de firmeza, acidez y contenido en sólidos solubles. Por otra parte, si un fruto ha sido almacenado durante demasiado tiempo y ha perdido la capacidad de producir un apropiado equilibrio de volátiles, entonces serán la firmeza, acidez y contenido de sólidos solubles los principales factores en determinar la aceptabilidad por parte de los consumidores.

2.4.3. Efecto sobre la calidad sensorial.

La aceptación de la fruta por parte de los consumidores se ha correlacionado con la producción de ciertos ésteres (Echeverría y col., 2004a). Por tanto, cabe pensar que las atmósferas con bajo nivel de oxígeno podrían provocar una disminución del valor comercial del producto como consecuencia de una disminución en la producción de algunos compuestos volátiles. Un estudio realizado en Australia reveló que después de probar una manzana mala, el consumidor responde cambiando de variedad, comprando menos manzanas, cambiando a otro fruto, parando de comprar durante un tiempo, cambiando a manzanas más caras o cambiando a otras marcas (Harker y col., 2008).

Se han realizado diversos estudios que demuestran que los frutos conservados en AC tienen una puntuación de aceptación sensorial más elevada con respecto a los frutos conservados en frío normal, a pesar de tener menos producción total de compuestos volátiles (Cliff y col., 1998 ; Lau, 1998; Plotto y col., 1999; Tough y Hewett, 2001; Echeverría y col., 2004a). Por ello, se cree que la concentración de algunos compuestos volátiles concretos es más importante que la emisión total de aromas para determinar la aceptación general del fruto. El análisis sensorial de manzanas almacenadas en AC demostró que la intensidad de los atributos afrutado y floral disminuye después de 10 semanas en AC, mientras que los valores de acidez y astringencia eran más altos en comparación con los de las manzanas almacenadas en FN; una cierta recuperación del aroma se detectó después de extraer las manzanas de las cámaras AC y transferirlas a aire normal (Plotto y col., 1999). Otro estudio realizado en las variedades 'Jonagold[®]', 'Golster' y 'Elstar' explica que, para las dos primeras variedades, se obtuvieron unos valores de firmeza más elevados y una mayor aceptación en los frutos conservados en AC respecto a los frutos conservados en FN. Sin embargo, para la variedad 'Elstar' no se encontraron diferencias entre atmósferas (Konopacka y Plochanski, 2004). Cliff y col. (1998) demostraron que las manzanas 'Gala' almacenadas durante 6 meses en condiciones AC eran más crocantes, firmes, jugosas, ácidas, con menos olores desagradables y con una mejor aceptación por parte del consumidor que las manzanas almacenadas en FN.

En manzanas 'Royal Gala[®]' (Moya-León y col., 2007) y 'Pink Lady[®]' (López y col., 2007), el almacenamiento en condiciones de atmósfera controlada (2 %O₂: 2 %CO₂, 1 %O₂: 1 %CO₂) mejoró la aceptación del fruto, indicando que esta tecnología permite mantener mejor la calidad de los frutos. En el caso de manzanas 'Fuji', la

aceptabilidad era mayor para aquellas manzanas almacenadas en condiciones de AC (2% O₂:2% CO₂, 1% O₂:1% CO₂, 1% O₂:3% CO₂) después de 7 meses de almacenamiento pero no se detectaron diferencias después de cortos periodos. Por otra parte, manzanas 'Fuji' almacenadas en condiciones 1% O₂: 1% CO₂ presentaban mayores puntuaciones de los atributos sensoriales de firmeza, sabor, acidez y apariencia (Echeverría y col., 2004e).

Dentro de la disciplina del análisis sensorial en alimentos para estudiar el papel de los volátiles en la percepción sensorial y las preferencias de consumo, se han utilizado básicamente dos modelos distintos: las soluciones o zumos (Young y col., 1996; Ball y col., 1998) y los purés (Rossiter y col., 2000; Marsh y col., 2006). Ambos modelos presentan el inconveniente de no aportar a los consumidores una impresión real de la textura de los frutos. La textura está determinada por las características de los tejidos del fruto (Harker y col., 1997); dos atributos de textura como la crocancia y la jugosidad juegan un papel muy importante en la determinación de las preferencias de los consumidores (Daillant-Spinnler y col., 1996).

2.5. Técnicas de regeneración del aroma en frutos almacenados en cámara.

Con el fin de mejorar la producción de los compuestos volátiles en manzanas (tanto a nivel total como a nivel de determinados compuestos volátiles individuales) después del almacenamiento en condiciones AC, se está investigando en diferentes líneas, tal como se describe a continuación.

2.5.1. Fecha de recolección más avanzada.

Este procedimiento se basa en permitir que las manzanas presenten un claro estado climatérico en el momento de cosecha y antes de entrar en la cámara. Con ello se posibilita una mayor capacidad de regeneración de la producción de compuestos volátiles en las manzanas al final del almacenamiento, ya que esta va aumentando con el avance del proceso de maduración de los frutos.

El estado de madurez en la recolección puede tener un importante efecto en la aceptación sensorial de manzanas después de su almacenamiento frigorífico. Así, por ejemplo, varias investigaciones han detectado diferencias en la concentración de volátiles, dependiendo del estado de madurez en manzanas 'Golden Delicious' (Song y

Bangerth, 1996; Eccher-Zerbini y col., 1996, 1999; Ferrandino y col., 2001), 'Fuji' (Plotto y col., 1995; Eccher-Zerbini y col., 1999; Fellman y col., 2003; Echeverría y col., 2004a), entre otras (Rizzolo y col., 2006; Moya-León y col., 2007).

Sin embargo, el retrasar la fecha de cosecha (hasta obtener un estado de madurez más avanzado) puede suponer la reducción del potencial de conservación del fruto y de ciertas características de calidad en el mismo, que se tienen muy en cuenta a nivel de productor y frigorista, tales como una elevada firmeza (para resistir la manipulación y evitar las consecuentes pérdidas) y un reducido viraje del color de la epidermis en manzanas.

2.5.2. Tratamiento con etileno.

Brackmann (1990) estudió si la inyección con etileno (5000 ppm), de manera continua en la cámara o adicionado a intervalos determinados durante el almacenamiento en ULO, tenía efectos en la producción de compuestos volátiles en manzanas 'Golden Delicious'. Aunque se encontraron ligeras diferencias en comparación con los frutos sin tratar (sólo en el caso de la presencia de altos valores de etileno en la cámara, pero no con aportaciones discontinuas), este autor concluyó que la producción de compuestos aromáticos no mejoraba de manera significativa. Otros autores han demostrado que la exposición a etileno externo durante 7 días a la salida del almacenamiento produjo un aumento en la producción de ésteres de cadena lineal mayor que para los ésteres de cadena ramificada, en manzanas 'Gala' almacenadas en AC (Mattheis y col., 2005). Además, el tratamiento de los frutos con 1-MCP redujo la producción de volátiles en comparación con los frutos no tratados (Defilippi y col., 2004; Mattheis y col., 2005; Kondo y col., 2005; Moya-León y col., 2007).

2.5.3. Tratamiento con precursores de aromas.

Se han realizado diversas investigaciones para aumentar el aroma de manzanas (mediante el incremento de la síntesis de los compuestos volátiles tipo éster) a partir del tratamiento con compuestos precursores. Así, De Pooter y col. (1983) trataron manzanas con ácidos propiónico y butírico y obtuvieron un aumento de los ésteres correspondientes. Bartley y col. (1985) demostraron que los alcoholes con los que trataban las manzanas eran convertidos a ésteres tipo acetato. Paz y col. (1982) y Pesis y

col. (1989) obtuvieron una potenciación del aroma en diversas especies (pera, tomate, fresa, naranja) mediante la aplicación de vapores de acetaldehído.

En el mismo trabajo de Brackmann (1990) antes mencionado, los frutos eran tratados con compuestos que son precursores del aroma, como alcoholes, ácidos y aldehídos. Este tratamiento mejoró la producción de volátiles aromáticos, pero los efectos se limitaban a pocos días; además, se presentaba el inconveniente de que sólo se mejoró la concentración de algunos de los típicos compuestos aromáticos de 'Golden Delicious'. Estudios más recientes corroboran estos resultados, en el sentido de que la adición de alcoholes y aminoácidos como precursores provocó un aumento en la producción de volátiles en distintas variedades de manzanas (Rowan y col., 1996; Harb y col., 2000). Así, este último trabajo (Harb y col., 2000) demostró que la adición de 1-butanol en manzanas 'Golden Delicious' causó un aumento en la concentración del acetato de butilo, butanoato de butilo, 2-metilbutanoato de butilo y acetato de propilo, mientras que disminuyó la concentración del acetato de hexilo, esto sería atribuible a que el aumento en la síntesis de acetato de butilo fue tan grande (130 %) que consumió el grupo acetato, por tanto no estaba disponible para la formación del acetato de hexilo.

2.5.4. Tratamientos de anaerobiosis.

Se conoce también que si se exponen los frutos, durante unas horas o semanas, a atmósferas de anaerobiosis (con la adición de nitrógeno o dióxido de carbono al 100%) se obtiene una potenciación de la concentración de varios volátiles aromáticos, como los ésteres etílicos (Ampun, 1997; Dixon y Hewett, 2000; Dixon y Hewett, 2001). Sin embargo, esto no puede ser aplicado en la conservación de fruta ya que estas condiciones de anaerobiosis acaban provocando un metabolismo fermentativo en el fruto, que conduce a una acumulación excesiva de etanol y acetaldehído, con los consecuentes daños fitotóxicos en los tejidos del fruto. De todas maneras, este tipo de investigaciones dan luz sobre posibles cambios en la calidad aromática que se puede producir en los frutos sometidos a tratamientos desinfectantes de cuarentena con atmósferas hipóxicas.

2.5.5. Almacenamiento en frío normal después de la conservación en AC.

En condiciones de ausencia de oxígeno, las reacciones de esterificación que dan lugar a los ésteres se detienen y, en consecuencia, las concentraciones de alcoholes aumentan. Una vez retorne el fruto a condiciones aeróbicas, estos alcoholes serán metabolizados otra vez a ésteres o compuestos de cadena corta antes de la esterificación, o se evaporaran en el tejido. Por lo tanto, después de sacar los frutos de las condiciones de hipoxia, habrá un incremento en la concentración de la mayoría de ésteres característicos del aroma en manzana (Dixon y Hewett, 2000).

En este sentido, la regeneración de la producción de volátiles volátiles después de 8 meses de almacenamiento en atmósfera controlada ULO fue significativamente mayor en aquellas manzanas 'Golden Delicious' que habían estado en frío normal durante un periodo adicional de 15 días a la salida de cámara (Brackmann, 1990).

Por otro lado, la permanencia de los frutos a 20 °C tras la salida de cámara también producía efectos sobre la producción de compuestos volátiles, diferentes según la variedad estudiada. Así, en manzanas 'Fuji' se observó un descenso de esta producción total de aromas a lo largo del periodo de permanencia a 20 °C (Echeverría y col., 2004a, 2004b). No obstante, López y col., (2000) encontraron que la producción total de compuestos volátiles en 'Golden Delicious' aumentaba al cabo de 5 días de salida de cámara para disminuir a los 10 días del periodo a 20 °C.

Un estudio en manzanas 'Gala' almacenadas durante 16 semanas en ULO (1% O₂: 1% CO₂) y durante un periodo adicional de 4 semanas en frío, mostró que, al final de la conservación, estos frutos presentaban mayor concentración total de volátiles que aquellos almacenados durante 20 semanas exclusivamente en ULO (Plotto y col., 1999). Un efecto similar se expresa en trabajos llevados a cabo con distintas variedades como 'Cox's Orange Pippin' (Smith, 1984), 'Golden Delicious' (Streif y Bangerth, 1988), 'McIntosh' (Yahia, 1991) y 'Bisbe Delicious' (Mattheis y col., 1995). Por tanto, la respuesta del fruto parece dependiente de la variedad, el estado de madurez en cosecha, las distintas atmósferas y otros factores culturales (Plotto y col., 1999).

La aplicación de este tratamiento en frío normal seguido de un período a 20 ° C puede ser beneficioso en la práctica para poder potenciar el aroma de las manzanas, sin problemas técnicos ni costes adicionales elevados en las centrales hortofrutícolas. Es por ello que se ha pretendido su estudio en la presente Tesis.

2.6. Bibliografía

- Aaby, K.; Haffner, K.; Skrede, G.** 2002. Aroma quality of Gravenstein apples influenced by regular and controlled atmosphere storage. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 35, 254-259.
- Abbott, J. A.; Affeldt, H. A.; Liljedahl, L. A.** 1992. Firmness measurement of stored 'Delicious' apples by sensory methods, Magness-Taylor, and sonic transmission. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117, 590-595.
- Aharoni, A.; Keizer, L. C.; Bouwmeester, H. J.; Sun, Z.; Alvarez-Huerta, M.; Verhoeven, H. A.; Blaas, J.; van Houwelingen, A. M.; De Vos, R. C.; van der Voet, H.; Jansen, R. C.; Guis, M.; Mol, J.; Davis, R. W.; Schena, M.; van Tunen, A. J.; O'Connell, A. P.** 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, 12, 647-662.
- Alavoine, F.; Crochon, M.; Bouillon, C.** 1990. Practical methods to estimate taste quality of fruit: how to tell it to the consumer. *Acta Horticulturae*, 259, 61-68.
- Alegre, S.; Casals, M.** 2006. Criteris de collita per poma Gala i Golden: l'opinió del consumidor. XI Jornada Frutícola.
- Amirav, A.; Hongwu, J.** 1995. Pulsed flame photometer detector for gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 67, 3305-3318.
- Ampun, W.** 1997. Enhancement of aroma volatile compounds in apples. PhD thesis, Dept Plant Science, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Anzaldúa-Morales, A.; Brennan, J. G.** 1984. La medición de la textura de frutas y verduras I. verduras frescas. *Tecnología Alimentaria*, 19-22.
- Argenta, L. C.; Fan, X.; Mattheis, J. P.** 2000. Delaying establishment of controlled atmosphere or CO₂ exposure reduces 'Fuji' apples CO₂ injury without excessive fruit quality loss. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 221-229.
- Argenta, L. C.; Mattheis, J. P.; Fan, X.; Finger, F. L.** 2004. Production of volatile compounds by Fuji apples following exposure to high CO₂ or low O₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5957-5963.
- Bai, J.; Baldwin, E. A.; Goodner, K. L.; Mattheis, J. P.; Brecht, J. K.** 2005. Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience*, 40, 1534-1538.
- Baldwin, E. A.; Nisperos, N. O.; Moshonas, M. G.** 1991a. Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for other constituents of two tomato varieties during ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 265-269.
- Baldwin, E. A.; Nisperos-Carriedo, M. O., Moshonas, M. G.** 1991b. Quantitative analysis of flavor parameters in six Florida tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1135-1140.
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Einstein, M. A.; Malundo, T. M. N.; Carr, B.T.; Shewfelt, R. L.; Tandon, K. S.** 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 23, 906-915.

- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K.; Schuch, W.** 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35, 1013-1021.
- Baldwin, E.** 2002. Fruit flavor, volatile metabolism and consumer perceptions. In *Fruit quality and its biological basis*; Knee, M., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL; pp 89-106.
- Baldwin, E. A.; Goodner, K. L.; Plotto, A.; Prichett, K.; Einstein, M.** 2004. Effect of volatiles and their concentration on perception of tomato descriptors. *Journal of Food Science*, 69, 310-318.
- Baldwin, E. A.; Plotto, A.; Goodner, K.** 2007. Shelf-life versus flavor-life for fruits and vegetables: how to evaluate this complex trait. *Stewart Postharvest Reviews*, 1, 1-10.
- Ball, R. D.; Murray, S. H.; Young, H.; Gilbert, J. M.** 1998. Statistical analysis relating analytical and consumer panel assessments of kiwifruit flavour compounds in a model juice base. *Food Quality and Preference*, 9, 255-266.
- Bangerth, F., Streif, J., Song, J., Brackmann, A.** 1998. Investigations into the physiology of volatile aroma production of apple fruits. *Acta Horticulturae*, 464, 189-194.
- Baritelle, A. L.; Hyde, G. M.** 2001. Commodity conditioning to reduce impact bruising. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 331-339.
- Bartley, I. M.; Stoker, P. G.; Martín, A. D. E.; Hatfield, S. G. S.; Knee, M.** 1985. Synthesis of aroma compounds by apples supplied with alcohols and methyl esters of fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 567-574.
- Beaudry, R.** 2000. Aroma generation by horticultural products: what can we control?. *HortScience*, 35, 1001-1002.
- Beekwilder, J.; Alvarez-Huerta, M.; Neef, E.; Verstappen, F. W.; Bouwmeester, H. J.; Aharoni, A.** 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135, 1865-1878.
- Beltrán, B.; Cuadrado, C.** 2000. *Tendencias de la alimentación de los españoles. Propiedades saludables y nutritivas de frutas y hortalizas*, Ediciones de Horticultura S.L., pp. 132-137.
- Benavides, A.; Recasens, I.; Casero, T.; Puy, J.** 2001. Chemometric analyses of 'Golden Smoothee' apples treated with two preharvest calcium spray strategies in the growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 943-952.
- Berger, R. G.; Drawert, F.** 1984. Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to Red Delicious apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 1318-1325.
- Billy, L.; Mehinagic, E.; Royer, G.; Renard, C. M. G. C.; Arvisenet, G.; Prost, C.; Jourjon, F.** 2008. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 315-324.
- Brackmann, A.** 1990. Possibilities of aroma improvement in apples during CA storage. In *XXIII International Horticultural Congress*; ISHS: Firenze, 2, 3316.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.

- Brackman, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1994. Influence of CA and ULO storage conditions on quality parameters and ripening of preclimateric and climateric harvested apples. *Gartenbauwissenschaft*, 59, 252-257.
- Brackmann, A.; Mazaro, S. M.; Bortoluzzi, G.** 1995. Quality of 'Fuji' apples under controlled atmosphere. *Ciencia Rural*, 25, 215-218.
- Bramlage, W. J.** 1993. Interactions of orchard factors and mineral nutrition on quality of pome fruit. *Acta Horticulturae*, 326, 15-28.
- Brecht, J. K.; Salveit, M. E.; Talcott, S. T.; Schneider, K. R.; Felkey, K.; Bratz, J. A.** 2004. Fresh-cut vegetables and fruits. *Horticultural Reviews*, 30, 185-251.
- Brichford, N.; Parry, R.** 1997. Fast GC/MS characterization of flavor mixtures. *Food Testing and Analysis*, 3, 18-21.
- Brockhoff, P.; Skovgaard, I.; Poll, L.; Hansen, K. A.** 1993. Comparison of methods for linear prediction of apple flavour from gas chromatographic measurements. *Food Quality and Preference*, 4, 215-222.
- Brovelli, E. A.** 2006. Pre- and postharvest factors affecting nutraceutical properties of horticultural products. *Stewart Postharvest Reviews*, 2, 1-6.
- Brückner, B.** 2008. Consumer acceptance of fruit and vegetables: the role of flavour and other quality attributes. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie S. G., Eds.; CRC Press: Washington, DC; pp 11-18.
- Buttery, R.G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor tomato and other vegetables and fruits. In *Flavor science: Sensible principles and techniques*; Acree, T. E., Teranishi, R., Eds.; American Chemistry Society: Washington, DC; pp 259-286.
- Bussarkorn, S.; Mpelasoka, M.; Hossein, B.** 2001. Production of aroma volatiles in response to deficit irrigation and to crop load in relation to fruit maturity for 'Braeburn' apple. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 1-11.
- Carpenter, R. P.; Lyon, D. H.; Hasdell, T. A.** 2000. Guidelines for Sensory Analysis. In *Food Product Development and Quality control*; 2nd edition. Aspen Publishers, Inc.: Githersburg, M. D.; pp. 210.
- Caspari, H. W.; Neal, S.; Alspach, P.** 2004a. Partial rootzone drying. A new deficit irrigation strategy for apple?. *Acta Horticulturae*, 646, 93-100.
- Caspari, H. W.; Einhorn, T. C.; Leib, B. G.; Redulla, C. A.; Andrews, P. K.; Lombardini, L.; Auvil, T.; McFerson, J. R.** 2004b. Progress in the development of partial rootzone drying of apple trees. *Acta Horticulturae*, 664, 125-132.
- Chen, G.; Hackett, R.; Taylor, A.; Lin, Z.; Grierson, D.** 2004. Identification of a specific isoform of tomato LOX (tomLoxC) involved in the generation of fatty acid derived flavour compounds. *Plant Physiology*, 136, 2641-2650.
- Chung, H. S.; Moon, K. D.; Chung, S. K.; Choi, J. U.** 2005. Control of internal browning and quality improvement of 'Fuji' apples by stepwise increase of CO₂ level during controlled atmosphere storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 883-888.
- Cliff, M. A.; Marjorie, K.C.; MacDonald, R. A.** 1998. Sensory characteristics of four strains of 'Fuji' apples. *Fruit Varieties Journal*, 52, 205-210.

- Crisosto, C. H.; Crisosto, G. M.** 2002. Understanding American and Chinese consumer acceptance of 'Redglobe' table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 155-162.
- Crisosto, C. H.; Crisosto, G. M.; Metheney, P.** 2003. Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 159-167.
- Cunningham, D. G.; Acree, T. E.; Barnard, J.; Butts, R. M.; Breall, P. A.** 1986. Charm analysis of apple volatiles. *Food Chemistry*, 19, 137-147.
- Dallant-Spinnler, B.; MacFie, H. J. H.; Beyts, P. K.; Hedderley, D.** 1996. Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. *Food Quality and Preference*, 7, 113-126.
- DeEll, J. R.; van Kooten, O.; Prange, R. K.; Murr, D. P.** 1999. Applications of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. *Horticultural Reviews*, 23, 69-117.
- DeEll, J. R.; Khanizadeh, S.; Saad, F.; Ferree, D. C.** 2001. Factors affecting apple fruit firmness—a review. *Journal of the American Pomological Society*, 55, 8-27.
- DeEll, J. R.; Murr, D. P.; Porteous, M. D.; Rupasinghe, H. P. V.** 2002. Influence of temperature and duration of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 349-353.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5694-5701.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- DeLong, J. M.; Prange, R. K.; Harrison, P. A.** 2004. The influence of pre-storage delayed cooling on quality and disorder incidence in 'Honeycrisp' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 353-358.
- DeLong, J. M.; Prange, R. K.; Harrison, P. A.** 2007. Chlorophyll fluorescence-based low oxygen storage of organic 'Cortland' and 'Delicious' apples. *Acta Horticulturae*, 737, 31-37.
- De Jager, A.; Johnson, D.; Höhn, E.** 1996. Determination and prediction of optimum harvest date of apples and pears. In *COST 94: The Postharvest Treatments of Fruit and Vegetables*; Office for Official Publications of the European Communities. Lofthus: Norway.
- Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural.** 2009. Generalitat de Catalunya. Disponible en internet: www.gencat.cat. Consultado: 12 de Agosto de 2009.
- De Pooter, H. L.; Montens, J. P.; Willaert, G. A.; Dirinck, P. J.; Schamp, N. P.** 1983. Treatment of Golden Delicious apples with aldehydes and carboxylic acids: effect on the headspace composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 813-818.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C.** 1983. Review of apple flavor—state of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 387-409.

- Dirinck, P.; Schamp, N.** 1989. Instrumental aroma analysis for objective evaluation of the parameters influencing aroma formation in apples and for prediction of the optimum picking date. *Acta Horticulturae*, 258, 421-428.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Temperature of hypoxic treatment alters volatile composition of juice from 'Fuji' and 'Royal Gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 71-83.
- Doyon, G.; Gaudreau, G.; St-Gelais, D.; Beaulieu, Y.; Randall, C. J.** 1991. Simultaneous HPLC determination of organic acids, sugars and alcohols. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24, 87-94.
- Drake, S. R.; Elfving, D. C.** 1999. Quality of 'Fuji' apples after regular and controlled atmosphere storage. *Fruit Varieties Journal*, 53, 193-198.
- Eccher-Zerbini, P. E.; Pianezzola, A.; Grassi, M.** 1996. Preservation of the quality and nutritional value of fruit and vegetables by CA storage. *Acta Horticulturae*, 379, 321-328.
- Eccher-Zerbini, P. E.; Pianezzola, A.; Grassi, M.** 1999. Poststorage sensory profiles of fruit of five apple cultivars harvested at different maturity stages. *Journal of Food Quality*, 22, 1-17.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2002. Effect of harvest date and storage conditions on quality and aroma production of 'Fuji' apples. *Food Science and Technology International*, 8, 351-359.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004a. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of 'Fuji' apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004b. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G.; Graell, J.; Lopez, M. L.; Lara, I.** 2004c. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.
- Echeverría, G., Correa, E., Ruiz-Altisent, M., Graell, J., Puy, J., López, L.** 2004d. Characterization of 'Fuji' apples from different harvest dates and storage conditions from measurements of volatiles by gas chromatography and electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3069-3076.
- Echeverría, G.; Lara, I.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004e. Assessment of relationships between sensory and instrumental quality of controlled-atmosphere-stored 'Fuji' apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.
- Einhorn, T.; Caspari, H. W.** 2004. Partial rootzone drying and deficit irrigation of 'Gala' apples in a semi-arid climate. *Acta Horticulturae*, 664, 197-204.
- Elgar, H. J.; Burmeister, D. M.; Watkins, C. B.** 1998. Storage and handling effects on a CO₂-related internal browning disorder of 'Braeburn' apple. *HortScience*, 33, 719-722.
- Fan, X.; Mattheis, J. P.; Patterson, M. E.; Fellman, J. K.** 1997. Optimum harvest date and controlled atmosphere storage of 'Fuji' apples. In *Apples and Pears. Proceedings of the 7th International CA Conference-2*; Mitcham, E. J., Ed.; pp. 235-240.

- Fan, X.; Mattheis, J. P.; Buchanan, D.** 1998. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1959-1963.
- Fan, X.; Blankenship, S. M.; Mattheis, J. P.** 1999. Development of apple superficial scald, soft scald, core flush and greasiness is reduced by MCP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3063–3068.
- FAOSTAT.** 2009. Disponible en internet: <http://faostat.fao.org>. Consultado: 26 de Noviembre de 2009.
- Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.; Matthinson, D. S.; Bostick, B. C.** 1991. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in ‘Delicious’ apples. *HortScience*, 27, 773-776.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Bostick, B.; Mattheis, J. P.; Patterson, M.** 1993. Ester biosynthesis in ‘Rome’ apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 3, 201-214.
- Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.** 1995. Ester biosynthesis in relation to harvest maturity and controlled-atmosphere storage of apples In *Fruit flavors: biogenesis, characterization, and authentication*, Leahy, M., Rouseff, R., Eds.; American Chemical Society: Washington DC; pp. 149-162.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Fan, X.; Mattheis, J. P.** 1997. ‘Fuji’ apple storage characteristics in relation to growing conditions and harvest maturity in Washington State. In *Apples and Pears. Proceedings of the 7th International CA Conference-2*; Mitcham, E. J., Ed.; pp. 235-240.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of ‘Delicious’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Ferrandino, A.; Duverney, C.; Di Stefano, R.** 2007. The evolution of apple volatiles during storage as influenced by fruit maturity. *Italian Journal of Food Science*, 19, 375-389.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in ‘Delicious’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Ferenczi, A.; Song, J.; Tian, M.; Vlschonasios, K.; Dilley, D.; Beaudry, R.** 2006. Volatile esters suppression and recovery following 1-methylcyclopropene application to apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131, 691-701.
- Forney, C. F.; Kalt, W.; Jordan, M. A.** 2000. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity and storage. *HortScience*, 35, 1022-1025.
- Frenkel, C.; Patterson, M. E.** 1973. Effect of carbon dioxide on the activity of succinic dehydrogenase in ‘Barlett’ pears during cold storage. *HortScience*, 8, 395-396.
- Gasser, F.; Eppler, T.; Naunheim, W.; Gabioud, S.; Hoehn, E.** 2008. Control of the critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. *Acta Horticulturae*, 796, 69-76.
- Goff, S. A.; Klee, H. J.** 2006. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value. *Science*, 311, 815-819.

- Goodner, K. L.; Baldwin, E. A.; Jordán, M. J.; Shaw, P. E.** 2000. The use of an electronic nose to differentiate NFC orange juices. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 113, 304-306.
- Gorney, J. R.; Kader, A. A.** 1996. Controlled-atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxidase in “Golden Delicious” apples during long-term storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121, 751–755.
- Graell, J.; Larrigaudiere, C.; López, M. L.** 1997. Effect of low-oxygen atmospheres on quality and superficial scald of ‘Topred’ apples. *Food Science and Technology International*, 3, 203-211.
- Guadagni, D. G.; Bomben, J. L.; Hudson, J. S.** 1971. Factors influencing the development of aroma in apple peels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 110-115.
- Hampson, C. R.; Quamme, H. A.; Hall, J. W.; MacDonald, R. A.; King, M. C.; Cliff, M. A.** 2000. Sensory evaluation as a selection tool in apple breeding. *Euphytica*, 111, 79-90.
- Hampson, C. R.; Quamme, H. A.; Brownlee, R. T.** 2002. Canopy growth, yield, and fruit quality of ‘Royal Gala’ apple trees grown for 8 years in five tree training systems. *HortScience*, 37, 627–631.
- Hansen, K.; Poll, L.; Olsen, C.; Lewis, M.** 1992. The influence of oxygen concentration in storage atmospheres on the post-storage volatile ester production of ‘Jonagold apples’. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 25, 457-461.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1994. Synthesis of aroma compounds by controlled atmosphere (CA) stored apples supplied with aroma precursors: alcohols, acids and esters. *Acta Horticulturae*, 368, 142-149.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 2000. Response of controlled atmosphere (CA) stored ‘Golden Delicious’ apples to the treatments with alcohols and aldehydes as aroma precursors. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 154-161.
- Harb, J.; Bisharat, R.; Streif, J.** 2008. Changes in volatile constituents of blackcurrants (*Ribes nigrum* L. cv. ‘Titania’) following controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 271-279.
- Harker, F. R.; Stec, M. G. H.; Hallet, I. C.; Bennett, C. L.** 1997. Texture of parenchymatous plant tissue: A comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biology and Technology*, 11, 63–72.
- Harker, R.** 2002. Improve fruit quality to increase demand. *Good Fruit Grower*, 53, 27.
- Harker, F. R.; Gunson, F. A.; Jaeger, S. R.** 2003. The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 333–347.
- Harker, F. R.; Gunson, F. A.; Triggs, C. M.** 2006. Apple firmness: Creating a tool for product evaluation based on a sensory-instrumental relationship. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 327–330.
- Harker, F. R.; Kupferman, E. M.; Marin, A. B.; Gunson, F. A.; Triggs, C. M.** 2008. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 70-78.
- Herregods, M.; Goffings, Y.** 1994. The storage of ‘Jonagold’ apples in ULO – Circumstances. *Acta Horticulturae*, 343, 148-154.
- Hewett, E. N.; Dixon, J.; Ampun, W.; Hamish, J.** 1999. Fruit flavor is important. *The Orchardist magazine*.

- Hoehn, E.; Gasser, F.; Guggenbühl, B.; Künsch, U.** 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 27-37.
- Iglesias, I.; Carbó, J.; Bonany, J.; Dalmau, R.; Guanter, G.; Montserrat, R.; Moreno, A.; Pagès J. M.** 2000. *Pomera: Les varietats de més interès*. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries: Barcelona.
- Iglesias, I.** 2002. Tendencias de la producción y de los intercambios comerciales de manzana a escala mundial y europea (Especial Manzano II). *Fruticultura Profesional*, 128, 7-23.
- Iglesias, I.; Echeverría, G.** 2009. Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Scientia Horticulturae*, 120, 41-50.
- Jaeger, S. R.; Andani, Z.; Wakeling, I. N.; MacFie, H. J. H.** 1998. Consumer preferences for fresh and aged apples: a cross-cultural comparison. *Food Quality and Preference*, 9, 355-366.
- Jaeger, S. R.; Rossiter, K. L.; Lau, K.** 2005. Consumer perceptions of novel fruit and familiar fruit: a repertory grid application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 480-488.
- Jayant, S.; Song, J.; Rubinstein, N. M.; Chong, A.; Beaudry, R. M.** 2002. Temporal relationship between ester biosynthesis and ripening events in bananas. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 998-1005.
- Johnston, J. W.; Hewett, E. W.; Hertog, M. L. A. T. M.** 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30, 145-160.
- Johnson, D. S.; Ridout, M. S.** 2000. Effects on the quality of stored apple fruit. In *Fruit & vegetable quality. An integrated review*; Shewfelt, R. L., Brückner, B., Eds.; Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA; pp 67-84.
- Johnson, D. S.** 2003. Improvement in the storage quality of apples in the UK by the use of 1-MCP (SmartFresh). *Acta Horticulturae*, 59, 39-47.
- Jones, R. B.; Faragher, J. D.; Winkler, S. A.** 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 1-8.
- Kader, A. A.** 2004. A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortScience*, 38, 1004-1008.
- Kakiuchi, N.; Moriguchi, S.; Fukuda, H.; Ichimura, N.; Kao, I.; Banba, I.** 1986. Composition of volatile compounds of apple fruits in relation to cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55, 280-289.
- Karlsen, A. M.; Aaby, K.; Siverstsen, H.; Baardseth, P.; Ellekjær, M. R.** 1999. Instrumental and sensory analysis of fresh Norwegian and imported apples. *Food Quality and Preferences*, 10, 305-314.
- Kikuchi, T.; Arakawa, O.; Norton, R. N.** 1997. Improving skin color of 'Fuji' apple in Japan. *Fruit Varieties Journal*, 51, 71-75.
- Knee, M.; Hatfield, S. G. S.** 1981. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 593-600.
- Kollmannsberger, H.; Berger, R. G.** 1992. Precursor atmosphere storage induced flavor changes in apple cv. 'Red Delicious'. *Chemical Mikrobiologie Technologie Lebensmittel*, 14, 81-86.

- Kondo, M.; Oyama-Okubo, N.; Ando, T.; Marchesi, E.; Nakayama, M.** 2005. Floral scent diversity is differently expressed in emitted and endogenous compounds in *Petunia axillaris* lines. *Annals of Botany*, 98, 1253-1259.
- Konopacka, D.; Plochanski, W. J.** 2004. Effect of storage conditions on the relationship between apple firmness and texture acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 205-211.
- Kupferman, E.** 2003. Controlled atmosphere storage of apples and pears. *Acta Horticulturae*, 600, 729-735.
- Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 29-39.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.
- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M.L.** 2007. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6087-6095.
- Lau, O. L.** 1998. Effect of growing season, harvest maturity, waxing, low O₂ and elevated CO₂ on flesh browning disorders in 'Braeburn' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 131-141.
- Lavilla, T.; Puy, J.; López, M. L.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Relationship between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in Granny Smith apples stored in different controlled-atmosphere treatments by means of multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3791-3803.
- Lawless, H. T.; Heymann, H.** 1999. Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices. Aspen Publishers, Inc.: Gaithersburg, MD; pp. 827.
- Lee, J. B.; Choi, J. U.** 1997. Effect of CA storage conditions on the internal breakdown of Fuji apple fruit under CA storage. *Korean Journal Food Science and Technology*, 4, 227-235.
- Lee, S. K.; Kader, A. A.** 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Leone, A.; Bleve-Zacheo, T.; Gerardi, C.; Melillo, N. M.; Leo, L.; Zacheo, G.** 2006. Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6835-6844.
- Lespinasse, N.; Scandella, D.; Vaysse, P.; Navez, B.** 2002. Mémento évaluation sensorielle des fruits et légumes frais. CTIFL.
- Leshem, Y. Y.; Ferguson, I. B.; Grossman, S.** 1984. On ethylene, calcium, and oxidative mediation of whole apple fruit senescence by core control. In *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*; Fuchs, Y., Chalutz, E., Eds.; Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers: Boston, MA.
- Lester, G. E.** 2006. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *HortScience*, 41, 59-64.
- Li, D.; Xu, Y.; Xu, G.; Gu, L.; Li, D.; Shu, H.** 2006. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (MdAAT2) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, 67, 658-667.

- Lo Bianco, R.; Farina, V.; Avellone, G.; Filizzola, F.; Agozzino, P.** 2008. Fruit quality and volatile fraction of 'Pink Lady' apple trees in response to rootstock vigor and partial rootzone drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1325-1334.
- Lo Scalzo, R.; Lupi, D.; Giudetti, G.; Testoni, A.** 2003. Evolution of volatile composition of whole apple fruit cv Gala after storage. *Acta Horticulturae*, 600, 555-562.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998a. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Recasens, I.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998b. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by 'Starking Delicious' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 634-643.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- López, M. L.; Villatoro, C.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; Echeverría, G.** 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady[®]' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 55-66.
- Lurie, S.; Pre-Aymard, C.; Ravid, U.; Larkov, O.; Fallik, E.** 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv. Anna apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4251-4256.
- Marsh, K.B.; Volz, R. K.; Reay, P.** 1996. Fruit colour, leaf nitrogen level, and tree vigour in 'Fuji' apples. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24, 393-399.
- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley J. and Sons Eds.; Chichester; pp. 116-165.
- Matich, A. J.; Rowan, D. D.; Banks, N. H.** 1996. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Analytical chemistry*, 68, 4114-4118.
- Matich, A.; Rowan, D.** 2007. Pathways analysis of branched-chain esters biosynthesis in apples using deuterium labeling and enantioselective gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2727-2735.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 194-199.
- Mattheis, J. P.; Fellman, J. K.** 1999. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 227-232.
- Mattheis, J. P.; Fellman, J. K.** 2000. Impacts of modified atmosphere packaging and controlled atmosphere on aroma, flavor, and quality of horticultural commodities. *HortTechnology*, 1, 507-510.

- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- Meberg, K. R.; Haffner, K.; Rosenfeld, H. J.** 2000. Storage and shelf-life of apples grown in Norway I. Effects of controlled atmosphere storage on 'aroma'. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 9-16.
- 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.** 1999. *Sensory evaluation techniques*. 3rd edition. Boca Raton: CRC Press; 387.
- Miller, T. W.; Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.; Mattinson, J. P.** 1998. Factors that influence volatile ester biosynthesis in 'Delicious' apples. *Acta Horticulturae*, 464, 195-200.
- Milosevic, N.; Milosevic, T.; Gísic, I.** 2009. Productive and organoleptic traits of recent apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 825, 565-570.
- Mpelasoka, B.S.; Behboudian, M. H.** 2002. Production of aroma volatiles in response to deficit irrigation and to crop load in relation to fruit maturity for 'Braeburn' apple. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 1-11.
- Moya-León, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C.; Pereira, M.; Moggia, C.** 2007. Development of aroma compounds and sensory quality of 'Royal Gala' apples during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 403-413.
- Nunes, M. C. N.** 2008. Impact of environmental conditions on fruit and vegetable quality. *Stewart Postharvest Review*, 4, 1-14.
- Ojeda-Real, L. A.; Lobit, P.; Cárdenas-Navarro, R.; Grageda-Cabrera, O.; Farías-Rodríguez, R.; Valencia-Cantero, E.; Macías-Rodríguez, L.** 2009. Effect of nitrogen fertilization on quality markers of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Aromas). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 935-939.
- Paillard, N. M. M.** 1979. Biosynthese des produits volatils de la pomme: formation des alcools et des esters a partir des acides gras. *Phytochemistry*, 18, 1165-1171.
- Paillard, N. M. M.** 1990. The flavour of the apples, pears and quinces. In *Food Flavours, Part C The flavour of fruits*, Morton, I. D., MacLeod, A. J., Eds.; Elsevier Science Publishing Company Inc.: Amsterdam, The Netherlands; pp 1-2.
- Paz, O.; Janes, H.; Prevost, B.; Frenkel, C.** 1982. Enhancement of fruit sensory quality by postharvest applications of acetaldehyde and ethanol. *Journal of Food Science*, 47, 270-276.
- Péneau, S.; Hoehn, E.; Roth, H. R.; Escher, F.; Nuesli, J.** 2006. Importance and consumer perception of freshness of apples. *Food Quality and Preference*, 17, 9-19.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, J. M.** 1993. Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1462-1466.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Ríos, J. J.; Olías, J. M.** 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3286-3290.

- Pérez, A. G.; Luaces, P.; Ríos, J. J.; García, J. M.; Sanz, C.** 2003. Modification of volatile compounds profile of virgin olive oil due to water-heat treatment on olive fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6544-6549.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.** 2008. Formation of fruit flavour. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds; CRC Press: Washington, DC; pp 43-70.
- Pesis, E.** 1989. Enhancement of fruit aroma and quality by acetaldehyde or anaerobic treatment before storage. *Acta Horticulturae*, 368, 365-373.
- Pesis, E.** 2005. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 1-19.
- Plotto, A.; Azarenko, A. N.; Mattheis, J. P.; McDaniel, M. R.** 1995. 'Gala', 'Braeburn', and 'Fuji' apples: Maturity Indices and Quality After Storage. *Fruit Varieties Journal*, 49, 133-142.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 1999. Characterization of 'Gala' apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Plotto, A.; Chandler, C. K.** 2006. Taste panels evaluate quality of five University of Florida strawberry selections. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 117, 308-311.
- Podoski, B. W.; Sims, C. A.; Sargent, S. A.; Price, J. F.; Chandler, C. K.; Okeefe, S. F.** 1997. Effects of cultivar, modified atmosphere, and pre-harvest conditions on strawberry quality. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 110, 246-252.
- Poll, L.** 1981. Evaluation of 18 apple varieties for their suitability for juice production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 1081-1090.
- Porta, H.; Rocha-Sosa, S.** 2002. Plant Lipxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*, 130, 15-21.
- Prange, R. K.; DeLong, J. M.; Harrison, P. A.** 2003. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in chlorophyll-containing fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 603-607.
- Racsó, J.; Nagy, J.; Szabó, Z.; Soltész, M.; Holb, I. J.; Nyéki, J.** 2006. Alternate bearing of 'Golden Reinders' and 'Summered' apples. *International Journal of Horticultural Science*, 12, 77-85.
- Racsó, J.; Miller, D. D.; Duarte, E. E.; Szabó, Z.; Soltész, M.; Nyéki, J.** 2009. Consumer preference for apple cultivars grown in various countries: a case study with hungarian consumers. *Acta Horticulturae*, 831, 219-226.
- Raffo, A.; Kelderer, M.; Paoletti, F.; Zanella, A.** 2009. Impact of innovative controlled atmosphere storage technologies and postharvest treatments on volatile compound production in cv. Pinova apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 915-923.
- Ricks, D.; Woods, T.; Sterns, J.** 2000. Chain management and marketing performance in fruit industry. *Acta Horticulturae*, 536, 661-668.

- Rizzolo, A.; Grassi, M.; Eccher Zerbini, P.** 2006. Influence of harvest date on ripening and volatile compounds in the scab-resistant apple cultivar 'Golden Orange'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81, 681-690.
- Rossiter, K. L.; Young, H.; Walker, S. B.; Miller, M.; Dawson, D. M.** 2000. Effect of sugars and acids on consumer acceptability of kiwifruit. *Journal of Sensory Studies*, 15, 241-250.
- Rowan, D. D.; Lane, H. P.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B.** 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3276-3285.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wyllie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.
- Saftner, R. A.; Abbott, J. A.; Conway, W. S.; Barden, C. L.** 2003. Effects of 1-methylcyclopropene and heat treatments on ripening and postharvest decay development in "Golden Delicious" apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 120-127.
- Sancho, J.; Bota, E.; De Castro, J. J.** 1999. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Edicions de la Universitat de Barcelona. Estudi General.
- Sanz, C.; Olías, J. M.; Pérez, A. G.** 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*; Tomás-Barberán, F. A., Robins, R., Eds.; Oxford University Press Inc.: New York; pp 125-155.
- Schaffer, R. J.; Friel, E. N.; Souleyre, E. J. F. Bolitho, K.; Thodey, K.; Ledger, S.; Bowen, J. H.; Ma, J. H.; Nain, B.; Cohen, D.; Gleave, A. P.; Crowhurst, R. N.; Janssen, B. J.; Yao, J. L.; Newcomb, R. D.** 2007. A Genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144, 1899-1912.
- Schrader, L. E.; Zhang, J.; Sun, J.; Zu, J.; Elfving, D. C.; Kahn, C.** 2009. Postharvest changes in internal fruit quality in apples with sunburn browning. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134, 148-155.
- Setser, C. S.** 1993. Sensory properties. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*; Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M. J., Eds.; Academic Press: London; pp 691-697.
- Shaw, P. E.; Rouseff, R. L.; Goodner, K. L.; Bazemore, R.; Nordby, H. E.; Widmer, W. W.** 2000. Comparison of headspace GC and electronic sensor techniques for classification of processed orange juices. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 33, 331-334.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.** 1997. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th edition. Brooks Cole, pp. 832.
- Smith, S. M.** 1984. Improvement of aroma of Cox's Orange Pippin apples stored in low oxygen atmospheres. *Journal of Horticultural Science*, 59, 515-522.
- Smith, T. J.** 2003. Apple orchard blocks evaluation. <http://www.ncw.wsu.edu> (julio 2009).
- Song, J.; Bangerth, F.** 1994. Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity. *Acta Horticulturae*, 368, 150-159.

- Song, J.; Bangerth, F.** 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 259-269.
- Song, J.; Gardener, B.; Holland, J.; Beaudry, R.** 1997. Rapid analysis of volatile flavour compounds in horticultural produce using SPME and GC/Time-of-Flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1801-1807.
- Song, J.; Fan, L.; Beaudry, R.** 1998. Application of solid phase microextraction and GC/TOFMS for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3721-3726.
- Song, J.** 2007. Flavour volatile production and regulation in apple fruit. *Stewart Postharvest Review*, 2, 1-8.
- Stampar, F.; Veberic, R.; Zadavec, P.; Hudina, M.; Usenik, V.; Solar, A.; Osterc, G.** 2002. Yield and fruit quality of apples cv. 'Jonagold' under hail protection nets. *Gartenbauwissenschaft*, 67, 205-210.
- Stow, J.** 1995. Quality measurements of apples. *Postharvest News Information*, 6, 32-33.
- Streif, J.; Bangerth, F.** 1988. Production of volatile aroma substances by 'Golden Delicious' apple fruits after storage for various times in different CO₂ and O₂ concentrations. *Journal of Horticultural Science*, 63, 193-199.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R.G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian Pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Tan, T.; Schmitt, V.; Isz, S.** 2001. Electronic tongue: a new dimension in sensory analysis. *Food Technology*, 55, 44-50.
- Terashini, R.; Kint, S.** 1993. Sample preparation. In *Flavor science: sensible principles and techniques*; Acree, T., Teranishi, R., Eds.; ACS Books: Washington DC; pp. 137-167.
- Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Röse, U. S. R.; Schnitzler, J. P.** 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45, 540-560.
- Thompson, A. K.** 1998. Recommended controlled atmosphere storage conditions for apples. In *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*; Thompson, A. K., Ed.; CAB International: Willingford; pp 117-141.
- Thomson, G. E.; Cotter, D. F.; Daly, P. A.** 1996. Temperature effects in bruise darkness of 'Granny Smith', 'Golden Delicious', and 'Jonathan' apples. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24, 99-101.
- Tieman, D. M.; Zeigler, M.; Schmelz, E. A.; Taylor, M. G.; Bliss, P.; Kirst, M.; Klee, H. J.** 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 57, 887-896.
- Toivonen, P. M. A.; Hampson, C.; Stan, S.; McKenzie, D. L.; Hocking, R.** 2007. Factors affecting severity of bruises and degree of apparent bruise recovery in a yellow-skinned apple. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 276-280.

- Tomala, K.; Barylko-Pikielna, N.; Jankowski, P.; Jeziorek, K.; Wasiak-Zys, G.** 2009. Acceptability of scab-resistant versus conventional apple cultivars by Polish adult and young consumer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1035-1045.
- Tough, H. J.; Hewett, E. W.** 2001. Rapid reduction in aroma volatiles of Pacific Rose™ apples in controlled atmospheres. *Acta Horticulturae*, 553, 219-223.
- Vayesse, P.; Landry, P.** 2004. *Pomme-Poire. Outils pratiques de la récolte au conditionnement*. CTIFL, Paris, pp. 123.
- Veberic, R.; Zadavec, P.; Stampar, F.** 2007. Fruit quality of ‘Fuji’ apple (*Malus domestica* Borkh.) strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 593-599.
- Villatoro, C.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2008. Long-term storage of Pink Lady apples modifies volatile-involved enzyme activities: consequences on production of volatile esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9166-9174.
- Villatoro, C.; López, M. L.; Echeverría, G.; Graell, J.** 2009. Effect of controlled atmospheres and shelf life period on concentrations of volatile substances released by ‘Pink Lady®’ apples and on consumer acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1023-1034.
- Volz, R. K.; Biasi, W. V.; Grant, J. A.; Mitcham, E. J.** 1998. Prediction of CA-induced flesh browning in ‘Fuji’ apple. *Postharvest Biology and Technology*, 13, 97-107.
- von Alvensleben, R.; Meier, T.** 1990. The influence of origin and variety on consumer perception. *Acta Horticulturae*, 259, 151-161.
- Wang, Y. T.; Huang, S. W.; Liu, R. L.; Jin, J. Y.** 2007. Effects of nitrogen application on flavor compounds of cherry tomato fruits. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170, 461-468.
- WAPA.** 2008. European Apple and Pear Crop Forecast. Ashford. United Kingdom.
- Watkins, C. B.; Nock, J. F.; Whitaker, B. D.** 2000. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19, 17-32.
- Watkins, C. B.; Kupferman, E.; Rosenberg, D. A.** 2004. Apple. In *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stock*; Gross, K. C., Wang, C. Y., Saltveit, M., Eds.; USDA Agricultural Handbook Number 66: USDA: Beltsville, MD.
- Watkins, C. B.** 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24, 389-392.
- Weis, S. A.; Bramlage, W. J.** 2002. 1-MCP: How useful can it be on New England Apples? *Fruit Notes*, 67, 5-9.
- Whitaker, B.D.** 2008. Postharvest flavour deployment and degradation in fruits and vegetables. In *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S.G., Eds; CRC Press: Washington, DC; pp 103-131.
- Wismer, W. V.; Harker, F. R.; Gunson, F. A.; Rossiter, K. L.; Lau, K.; Seal, A. G.; Lowe, R. G.; Beatson, R.** 2005. Identifying flavour targets for fruit breeding: a kiwifruit example. *Euphytica*, 141, 93-104.
- Wyllie, S.; Fellman, J.** 2000. Formation of volatile branched-chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3493-3496.

- Wyllie, S.G.** 2008. Flavour quality of fruit and vegetables: are we on the brink of major advances?. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S.G., Eds; CRC Press: Washington, DC; pp 3-11.
- World Apple Review.** 2007. Belrose Inc. – 1045 N.E. Creston Lane, Pullman, WA 99163-3806.
- Yahia, E. M.; Liu, F. W.; Acree, T. E.** 1990. Changes of some odour-active volatiles in controlled atmosphere-stored apples. *Journal of Food Quality*, 13, 185-202.
- Yang, X.; Peppard, T.** 1994. Solid phase micro-extraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1925-1930.
- Yilmaz, E.; Scott, J. W.; Shewfelt, R. L.** 2002. Effects of harvesting maturity and off-plant ripening on the activities of LOX and ADH enzymes in fresh tomato. *Journal Food Biochemistry*, 26, 443-471.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Young, J. C.; George Chu, C. L.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.
- Zanella, A.** 2003. Control of apple superficial scald and ripening – a comparison between 1-methylcyclopropene and diphenylamine postharvest treatments, initial low oxygen stress and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 69–78.
- Zanella, A.; Cazzanelli, P.; Panarese, A.; Coser, M.; Cecchinell, M.; Rossi, O.** 2005. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. *Acta Horticulturae*, 682, 1535-1542.



Objetivos

3. OBJETIVOS

Como objetivo general de la presente Tesis Doctoral se pretende mejorar la calidad de manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’ conservadas en atmósfera controlada con muy bajo nivel de oxígeno (‘ultra low oxygen’) mediante la regeneración de compuestos volátiles.

En base a dicho objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la influencia de un periodo en frío (2 ó 4 semanas) tras la conservación en muy bajo nivel de oxígeno (con un total de 19 y 30 semanas en conservación) sobre la producción de compuestos volátiles, la calidad estándar y la calidad sensorial de los frutos después de la vida comercial (1 y 7 días a 20 °C).
- Valorar el efecto de dos fechas de cosecha y de dos campañas consecutivas sobre la emisión de compuestos volátiles, la calidad estándar y la calidad sensorial en ambas variedades de manzana.
- Determinar los efectos de las condiciones de almacenamiento indicadas anteriormente sobre la actividad de las enzimas lipoxigenasa e hidroperóxido liasa así como establecer correlaciones entre dichas actividades enzimáticas y los compuestos volátiles producidos.
- Estimar la vida útil de las manzanas ‘Golden Reinders[®]’, mediante la determinación de la evolución de los compuestos volátiles, de los parámetros de calidad estándar y de la aceptación sensorial por parte del consumidor, a lo largo de distintos periodos de permanencia a 20 °C después de su almacenamiento.

El conjunto de resultados que se pretende obtener en la Tesis nos permitirán determinar las condiciones óptimas de manejo (tanto en cosecha, como durante la conservación y posterior vida útil) para ambas variedades de manzanas, para que los frutos presenten una excelente calidad organoléptica cuando lleguen a los consumidores, la falta de la cuál ha sido señalado como un punto crítico para la aceptación de las frutas por los consumidores.

Plan de trabajo



4. PLAN DE TRABAJO.

	2005		2006				2007				2008				2009			
	T ₃	T ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Formación académica y científica																		
Aprendizaje del funcionamiento del instrumental científico y metodologías de análisis																		
Cursos de doctorado																		
Asistencia a cursos complementarios																		
Recolección y salidas de cámara 'Fuji Kiku'® 8'																		
Cosechas y análisis momento de cosecha																		
Salida de los frutos (19 semanas) y análisis calidad instrumental, aromática y sensorial																		
Salida de los frutos (30 semanas) y análisis calidad instrumental, aromática y sensorial																		
Análisis actividad enzimática																		
Análisis estadístico																		
Recolección y salidas de cámara 'Golden Reinders'®																		
Cosechas y análisis momento de cosecha																		
Salida de los frutos (19 semanas) y análisis calidad instrumental, aromática y sensorial																		
Salida de los frutos (30 semanas) y análisis calidad instrumental, aromática y sensorial																		
Análisis actividad enzimática																		
Análisis estadístico																		
Estancias en centros nacionales e internacionales																		
Centro HortResearch (Nueva Zelanda)																		
CSIC-Instituto de la Grasa (Sevilla)																		
Kearney Agricultural Center (Universidad de California)																		
Redacción de la documentación																		
Consulta documentación científica																		
Elaboración trabajos de los cursos de doctorado																		
Elaboración contribuciones a congresos																		
Elaboración artículo científico 1																		
Elaboración del documento para obtener el Diploma de Estudios Avanzados (DEA)																		
Elaboración artículo científico 2																		
Elaboración artículo científico 3																		
Elaboración artículo científico 4																		
Elaboración artículo científico 5																		
Elaboración artículo científico 6																		
Elaboración artículo científico 7																		
Anejo (artículo científico 8)																		
Elaboración documento Tesis Doctoral																		

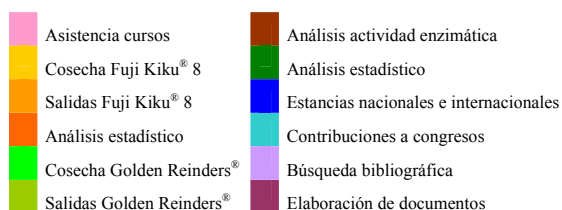


Figura 5. Cronograma de las distintas actividades realizadas a lo largo de la presente Tesis. FS: Primera campaña; SS: Segunda campaña; T: Trimestre

A lo largo de los años de realización de la Tesis, se han elaborado presentaciones de los resultados preliminares que se han expuesto en los siguientes congresos:

- (1) 8th Sensometrics meeting 'Imagine the senses'.
(1 Póster)
2-4 Agosto 2006 (Oslo, Noruega).
- (2) VIII Simposio Nacional y V Ibérico sobre maduración y post-recolección.
(1 Comunicación oral)
27-30 Septiembre 2006 (Orihuela, España).
- (3) V Congreso Iberoamericano de Tecnología Poscosecha y Agroexportaciones.
(1 Comunicación oral)
29 Mayo-1 Junio 2007 (Cartagena, España).
- (4) 7th Pangborn Sensory Science Symposium.
(1 Póster)
12-16 Agosto 2007 (Minneapolis, EEUU).
- (5) IX Simposio Nacional y V Ibérico sobre Maduración y Post-recolección.
(3 Póster)
23-26 Septiembre 2008 (Zaragoza, España).
- (6) Postharvest Unlimited 2008.
(1 Póster)
4-7 Noviembre 2008 (Berlin, Alemania)
- (7) 10th Internacional Controlled & Modified Atmosphere. Research Conference.
(1 Póster)
4-7 Abril 2009 (Antalya, Turquía).
- (8) 8th Pangborn Sensory Science Symposium.
(1 Póster)
26-30 Julio 2009 (Florencia, Italia).

A decorative illustration in the bottom-left corner of the page. It features a large, light pink circular shape with a floral pattern. From this circle, several thin, dark pink lines extend outwards, resembling stems or branches. These lines are adorned with small, dark pink leaves and a single butterfly. The butterfly is positioned above the main circular shape, and the lines curve downwards and to the right, ending near the bottom edge of the page. The overall style is soft and artistic, using a monochromatic pink color palette.

Diseño experimental y materiales

5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MATERIALES.

5.1. Diseño experimental

En el presente apartado se muestran las diferentes tareas y actividades realizadas a lo largo de las diferentes campañas, agrupadas en distintas experiencias para una mejor comprensión.

1. Experiencias sobre almacenamiento en cámara (los resultados se presenta en los capítulos 1-6).

A lo largo de tres campañas consecutivas (2005/2006, 2006/2007 y 2007/2008) se realizaron diversas experiencias en las que se contemplaron los siguientes factores:

- 2 campañas distintas: En el caso de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, se estudió el comportamiento de los frutos durante las campañas 2005/2006 y 2006/2007, mientras que, para la variedad ‘Golden Reinders[®]’, se evaluó su comportamiento durante las campañas 2006/2007 y 2007/2008.
- 2 fechas de recolección: Este estudio se realizó en la campaña 2006/2007, a partir de frutos (correspondientes a ambas variedades) que se recolectaron en 2 fechas (dentro del periodo recomendado comercialmente para la recolección de estas variedades). En el caso de ‘Fuji Kiku[®] 8’ ambas fechas distaban 11 días entre si, mientras que para ‘Golden Reinders[®]’ transcurrieron 8 días entre ambas cosechas.
- 3 condiciones de almacenamiento: Almacenamiento en atmósfera con muy bajo nivel de oxígeno (ULO: 1 %O₂ :1 %CO₂), y almacenamiento en esta misma atmósfera ULO más un periodo de 2 y 4 semanas en frío normal. Estas atmósferas se evaluaron en las tres campañas estudiadas y para las dos variedades.
- 2 periodos de almacenamiento: 4 y 7 meses (correspondientes a 19 y 30 semanas) en las tres campañas estudiadas y para las dos variedades.
- 2 periodos de vida comercial (maduración a 20 °C después del almacenamiento): 1 y 7 días, para simular el comportamiento de los frutos a lo largo de su periodo de comercialización. También se evaluaron en las tres campañas y para las dos variedades.

A continuación (Figuras 6-8) se indican esquemáticamente los diseños experimentales planteados en cada una de las campañas incluidas en este conjunto de experiencias realizadas en la presente Tesis.

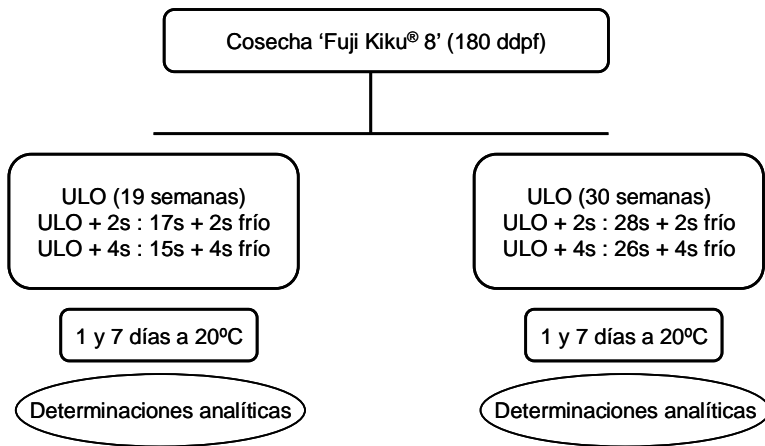


Figura 6. Esquema del diseño experimental en la campaña 2005/2006.

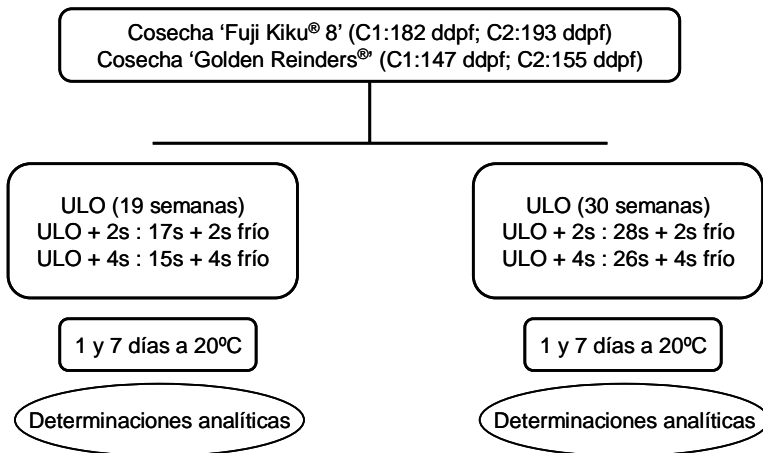


Figura 7. Esquema del diseño experimental en la campaña 2006/2007.

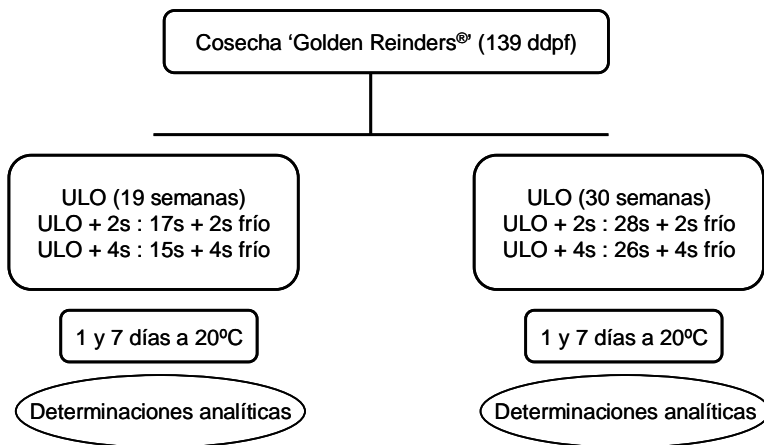


Figura 8. Esquema del diseño experimental en la campaña 2007/2008.

Las distintas determinaciones analíticas realizadas en los frutos se repitieron durante las 3 campañas, tanto en el momento de cosecha como al final del almacenamiento y posterior vida comercial. El tipo de determinaciones realizadas fueron las siguientes:

En el momento de cosecha:

- Parámetros estándar de madurez y calidad: firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez titulable, índice de almidón, peso, calibre y color de epidermis.
- Producción de etileno.
- Producción de compuestos volátiles.
- Actividad de las enzimas LOX y HPL (sólo en la campaña 2006/2007 y para ambas variedades).

Después del almacenamiento:

- Parámetros estándar de madurez y calidad: firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez titulable, índice de almidón, peso, calibre y color de epidermis.
- Producción de etileno.
- Producción de compuestos volátiles.

- Contenido de etanol y acetaldehído en el zumo del fruto.
- Actividad de las enzimas LOX y HPL (sólo en la campaña 2006/2007 y para ambas variedades).
- Grado de aceptación sensorial: mediante un panel de consumidores.
- Medida de los atributos sensoriales del fruto: mediante un panel de jueces entrenados.

2. Experiencia sobre vida útil pos-almacenamiento (los resultados se presentan en el capítulo 7).

En la campaña 2006/2007 se realizó una estimación de la vida útil en manzanas ‘Golden Reinders®’ estudiando los siguientes factores:

- Almacenamiento en condiciones ULO: Almacenamiento en atmósfera con muy bajo nivel de oxígeno (ULO: 1 % O₂:1% CO₂).
- 1 periodo de almacenamiento: 7 meses (correspondiente a 30 semanas).
- 5 periodos de vida comercial (maduración a 20 °C después del almacenamiento): 0, 7, 14, 21 y 28 días, para simular el comportamiento de los frutos a lo largo de su maduración con posterioridad al almacenamiento.

A continuación (Figura 9) se indica esquemáticamente el diseño experimental planteado para esta experiencia.

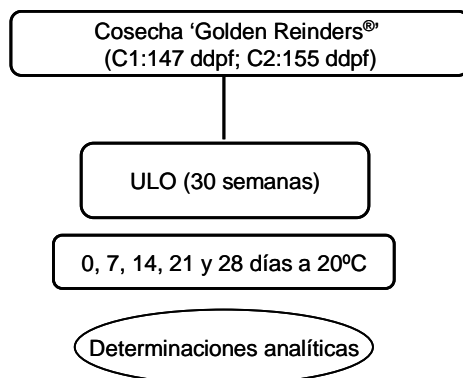


Figura 9. Esquema del diseño experimental de vida útil en la campaña 2006/2007.

El tipo de determinaciones realizadas fueron las siguientes:

En el momento de cosecha:

- Parámetros estándar de madurez y calidad: firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez titulable, índice de almidón, peso, calibre y color de epidermis.
- Producción de compuestos volátiles.

Después del almacenamiento:

- Parámetros estándar de madurez y calidad: firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez titulable, índice de almidón, peso, calibre y color de epidermis.
- Producción de compuestos volátiles.
- Grado de aceptación sensorial: mediante un panel de consumidores.

3. Experiencia sobre inyección de esencias (los resultados se presentan en el anejo).

En el año 2007 se realizó un estudio de inyección de esencias en tejido de manzanas ‘Pacific Rose[®]’. Este estudio se dividió en dos partes:

- Percepción de la intensidad de sabor: inyección de 1 μL , 2 μL y 3 μL de cada una de las esencias (chocolate, manzana, salmón y tropical).
- Evaluación por consumidores de sabores nuevos y familiares.

El tipo de determinaciones realizadas fueron las siguientes:

Percepción de la intensidad de sabor.

- Medida de la intensidad de sabor natural y sabor añadido mediante un panel de expertos.

Evaluación por consumidores

- Parámetros estándar de calidad: firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles y acidez titulable.
- Producción de compuestos volátiles.
- Grado de aceptación sensorial: mediante un panel de consumidores.

Cabe señalar que la descripción en detalle de los diversos procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para la determinación de los parámetros citados en los apartados anteriores aparece en la sección de Material y Métodos correspondiente a cada capítulo incluido en el apartado de Resultados de la presente Tesis.

5.2. Material vegetal.

Los frutos utilizados en las distintas experiencias que forman parte de la presente Tesis Doctoral procedían de una finca experimental ubicada en Mollerussa (Lleida) que pertenece al IRTA-Estación Experimental de Lleida. La Figura 10 muestra el tipo de plantación de ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’.



Figura 10. Plantación de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ (izquierda) y ‘Golden Reinders[®]’ (derecha).

En la siguiente Tabla se presentan las características de plantación para ambas variedades.

Tabla 3. Características de la plantación experimental para las variedades ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’.

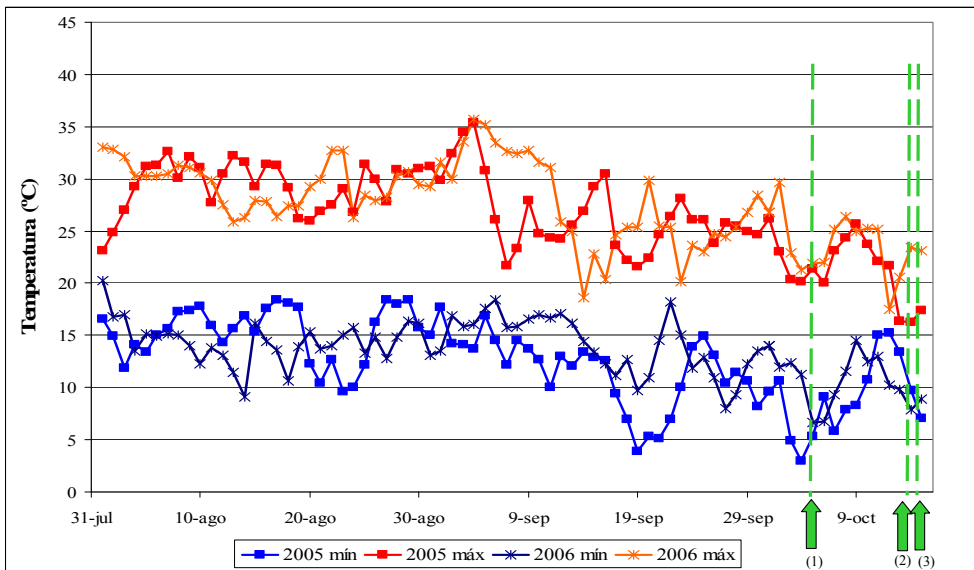
	Fuji Kiku[®] 8	Golden Reinders[®]
Año plantación	2004	2000
Patrón o portainjerto	M9-EMLA	M-9
Sistema de formación	Eje central	Eje central
Marco de plantación	4 m × 1,4 m	3,5 m × 1,3 m

El muestreo de frutos en la plantación se realizaba en cada una de las dos caras de las hileras de los árboles previamente seleccionados, eligiendo al azar frutos situados a diferentes alturas de cada árbol, descartando aquellos frutos que no reunían las

características deseadas (en cuanto a calibre mínimo, aspecto sano y madurez suficiente). Una vez recolectados, los frutos se depositaban en cajas de plástico (15 kg de capacidad) forradas con papel protector, siendo transportados así hasta el Centro UdL-IRTA (Lleida) y hasta la empresa NUFRI, S.A.T. (Mollerussa) donde eran introducidos en las cámaras frigoríficas. Previamente a la entrada en frío, no se realizaba ningún tratamiento químico con productos fungicidas o antiescaldantes.

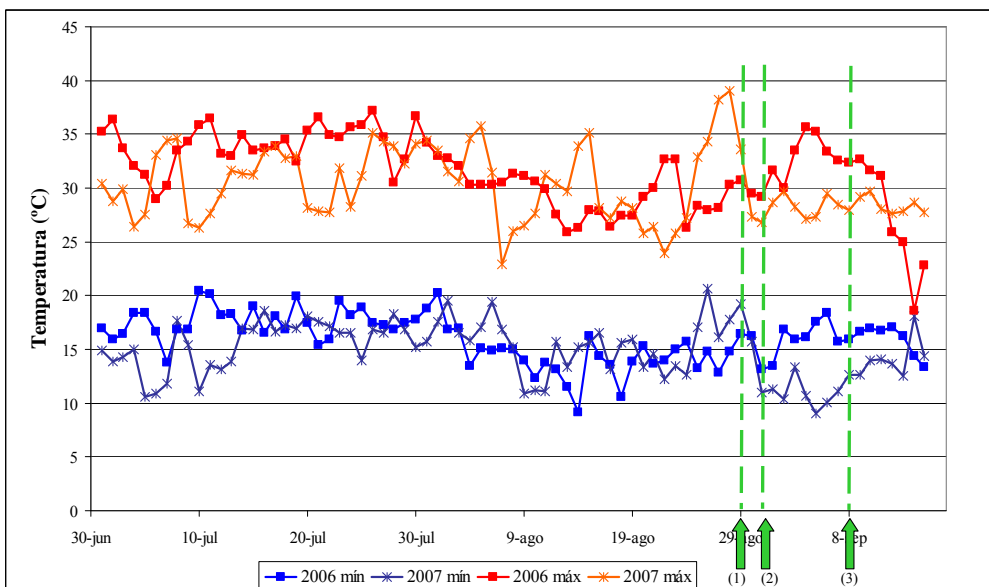
5.3. Datos climáticos.

A continuación se detallan las temperatura máximas y mínimas durante los meses estivales. La Figura 11 muestra la variación correspondiente al periodo 1 de agosto – 15 de octubre. La Figura 12 se corresponde al periodo 1 de julio-15 de septiembre.



(1) 5/10/06; (2) 14/10/05; (3) 16/10/06;

Figura 11. Variación de la temperatura máxima y mínima durante los meses de agosto, septiembre y octubre en los años 2005 y 2006 en relación a las campañas estudiadas en la variedad ‘Fuji Kiku® 8’. (1)(2)(3) Corresponden a las fechas de recolección en ambas campañas.



(1) 29/08/07; (2) 31/08/06; (3) 08/09/06;

Figura 12. Variación de la temperatura máxima y mínima durante los meses de julio, agosto y septiembre en los años 2006 y 2007 y en relación a las campañas estudiadas en la variedad 'Golden Reinders®'. (1)(2)(3) Corresponden a las fechas de recolección en ambas campañas.

5.4. Cámaras frigoríficas

Para la obtención de las diferentes atmósferas de almacenamiento a ensayar, se disponía de diversas cámaras experimentales ubicadas en el centro UdL-IRTA (Lleida) y de cámaras comerciales ubicadas en la empresa NUFRI S.A.T. (Mollerussa).

En el caso de las *cámaras experimentales*, éstas tienen una capacidad de 20 m³ y están equipadas con una instalación frigorífica indirecta (que permite mantener automáticamente unas bajas temperaturas de refrigeración y una alta humedad relativa) y con una instalación de atmósfera controlada que permite una rápida puesta a régimen y mantenimiento de las concentraciones de O₂ y CO₂ deseadas (rampa de inyección de nitrógeno y adsorbedores de carbón activo). El procedimiento estándar a utilizar en el pre-almacenamiento consistió en: un enfriamiento rápido de la fruta una vez ésta llega al centro (de tal manera que en menos de 48 horas se alcance la temperatura deseada en los frutos); a continuación, la atmósfera de las cámaras se barre con un flujo de nitrógeno hasta alcanzar los niveles de oxígeno deseados (en un tiempo no superior a 24 horas); posteriormente, la consecución del nivel de anhídrido carbónico deseado se

consigue en base al gas liberado por la propia fruta al respirar y mediante la inyección de anhídrido carbónico a partir de botellas de gas comprimido, si es necesario. Las concentraciones de gases son monitorizadas y controladas continuamente (las 24 horas de todos los días) con analizadores electrónicos (de infrarrojos para el anhídrido carbónico y paramagnético para el oxígeno) y con un ordenador con el programa adecuado para dicha regulación.

En el caso de las *cámaras de tipo comercial*, éstas presentan una capacidad de 1000 m³ y la producción de frío se realiza mediante una instalación indirecta con amoníaco. Para la generación y mantenimiento de la atmósfera controlada se dispone de un generador de N₂ (sistema PSA) y absorbedores de CO₂ (de carbón activo). Los tiempos de enfriamiento del fruto y de puesta a régimen de la atmósfera de las cámaras son similares a los señalados anteriormente. La regulación y control de las concentraciones de gases se lleva a cabo de forma automática.

Resultados



CAPÍTULO 1

Regeneration of volatile compounds in 'Fuji' apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability.

Rosa Altisent, Jordi Graell, Isabel Lara, Luisa López y Gemma Echeverría
Publicado en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008), 8490-8497.

Abstract

The aim of this work was to assess whether an extra time spent under air conditions after storage in an ultra low oxygen (ULO) atmosphere could allow the regeneration of volatile compound emission without negatively affecting quality parameters and the consumer acceptability of 'Fuji' apples. Fruits were stored for 19 and 30 weeks at 1 °C and 92% relative humidity under ULO atmosphere conditions (1% O₂:1% CO₂) or under ULO conditions followed by different periods (2 and 4 weeks) in cold air atmosphere (ULO+2w or ULO+4w, respectively). Standard quality and emission of volatile compounds were analyzed after storage plus 1 and 7 days at 20 °C. Sensory attributes and acceptability were also determined after 7 days at 20 °C. The extra period of 4 weeks in an air atmosphere after ULO storage resulted in an increase in the concentration of the compounds that most contribute to the flavor of 'Fuji' apples. These fruits were relatively well accepted by consumers despite a slight decline in firmness and acidity.

Keywords: acceptability, air storage, apple, aroma compounds, regeneration, standard quality parameters, ULO atmosphere.

1. Introduction

Historically, most guidelines for apple storage conditions have been based on a desire to maintain standard quality specifications such as color, firmness, acidity and sugar content in order to satisfy the goal of maximizing postharvest life and optimizing commercial quality. Even so, over the years, the lack of sensory quality exhibited by a lot of produce has resulted in a failure to satisfy consumer expectations and, in consequence, in a significant fall in apple sales. Producers and retailers should both be aware that if consumer satisfaction is achieved, a product will be accepted and repeat purchases will occur (Andani and MacFie, 1998).

Although current commercial practice often disregards aroma, this aspect is an important attribute influencing the sensory quality of apple fruit. The aroma profile of a fruit is complex and depends on the combination of all the volatile compounds emitted and also on the concentration and odor threshold of each individual compound. In apple, the aroma profile contains more than 300 volatile compounds, mainly including esters, alcohols, aldehydes, ketones and ethers; of these, the esters are quantitatively and qualitatively the most important volatile compounds contributing to apple aroma, and are associated with the “fruity” perceptions (Dixon and Hewett, 2000). The esters produced by a ripening apple can be separated into straight-chain and branched-chain types. Whereas straight-chain esters are thought to be derived from fatty acids, branched-chain esters are thought to originate from the metabolism of branched-chain amino acids (Sanz et al., 1997). The majority of these esters are synthesized during the climacteric phase of ripening (Song and Bangerth, 1996).

Controlled atmosphere (CA) storage is a well-established technique for maintaining fruit quality and extending the postharvest life of apples. It is well documented that CA with low concentration of O₂ offers great benefits for long-term storage in terms of maintaining texture, soluble solids and the acidity of apples, but has the drawbacks of reducing the production of some volatiles and consequently, producing fruit of poor flavor and aroma compared to that stored in air atmospheres (Sanz et al., 1997; Cliff et al., 1998; Eccher-Zerbini et al., 1999; López et al., 1999, 2000; Meberg et al., 2000; Plotto et al., 2000). The extent and speed of recovery of aroma volatile production after CA varies with the cultivar and storage time (Lidster et al., 1983; Echeverría et al., 2004a).

Several different techniques have been studied with the aim of achieving the regeneration of aroma volatile compounds after CA-storage: the treatment of fruit with ethylene during (Brackmann, 1990), or after storage (Mattheis et al., 2005); treatments with precursors of ester compounds such as alcohols, acids and aldehydes (Brackmann, 1990; Paz et al., 1982; De Pooter et al., 1983; Pesis et al., 1989); exposure to hypoxia atmospheres with 2% O₂ or up to 100% CO₂ (Dixon and Hewett, 2000; 2001); and exposure to an extra period under cold air conditions after storage (Brackmann, 1990). Due to its easy application in cold stores, the last of these possibilities may be interesting for the optimization of storage in order to obtain higher concentrations of aroma volatile compounds and to increase the consumer acceptability of fruits. If this does not result in an excessive reduction of the standard quality parameters of stored fruit, it could be recommended for commercial use.

‘Fuji’ apples stand out for their excellent sensory characteristics (Stebbins et al., 1991; Stebbins, 1992) and especially for their flavor (Stainer et al., 1996; Sarrazin, 1997; Ravaioli, 1998) and crunchiness (Stainer et al., 1994; Matinger, 1998), but also for their good storage potential. In previous works (Echeverría et al., 2002), we reported that ultra low oxygen (ULO) conditions (1% O₂) had the effect of reducing total volatile production in this cultivar after storage. Moreover, it was concluded that ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl acetate and hexyl acetate were the compounds that most contributed to ‘Fuji’ flavor. We also demonstrated the importance of certain aroma volatile compounds for consumer acceptability. In fact, higher acceptability scores were found for fruits with higher emissions of ethanol, t-butyl propionate, ethyl butanoate, hexyl acetate, (E)-2-hexenol, and butyl hexanoate, although these fruits did not always exhibit the highest total aroma emissions. This suggests that the concentration of some specific volatile compounds is more important than total aroma volatile emission for determining overall fruit acceptability (Echeverría et al., 2004b).

Due to the lack of recent studies on regeneration of volatile compounds and their importance in maintaining apple eating quality, we focus this work on ascertaining whether an additional period under cold air conditions after ULO storage could help to regenerate some of the volatile compounds in ‘Fuji’ apples without the loss of firmness, acidity and solid soluble content, as – if so - this would help to improve the sensory acceptance of the fruit.

2. Materials and methods.

Plant material and storage conditions

Apple (*Malus × domestica* Borkh. cv. ‘Fuji Kiku[®] 8’) fruits were harvested at commercial maturity (2005), 180 days after full bloom (dafb), from 4 year-old trees grown on M-9 EMLA rootstock at the IRTA-Experimental Station, Lleida (NE Spain). Immediately after harvest, 3 lots of 100 kg of apples were selected for uniformity and absence of defects and stored at 1 °C and 92-93% relative humidity (RH) in an ULO atmosphere (1% O₂ : 1% CO₂) for up to either 19 (S1) or 30 weeks (S2). One lot of ULO-stored fruit remained under these conditions for the whole 19 or 30 week (ULO) period. A second lot was kept for either 17 or 28 weeks under ULO conditions and then stored for 2 weeks in AIR (ULO+2w). A third batch of fruit was kept for either 15 or 26 weeks in ULO followed by a further 4 weeks in AIR (ULO+4w). After storage, the fruit was stored at 20 °C - in order to simulate commercial shelf-life – during 1 (SL1) and 7 (SL7) days. Instrumental quality measurements and volatile compound emission were measured after 1 and 7 days of fruit storage at 20 °C. Sensory analyses were only carried out after 7 days of storage at 20 °C.

Chemicals

The chemicals obtained were of the highest quality available and were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) unless otherwise indicated. Ethyl acetate, *t*-butyl propanoate, propyl acetate, 1-propanol, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, pentyl acetate, 2-methyl-1-butanol, hexyl acetate, 1-hexanol, hexyl 2-methylbutanoate and 2-ethyl-1-hexanol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was purchased from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain). 2-methylpropyl acetate and 2-methylciclo pentanone were obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain).

Analysis of volatile compounds

Eight kg of apples (2 kg/replicate × 4 replicates) per treatment (atmosphere × storage period × shelf-life period) were selected for analysis of volatile compounds both at harvest and after removal from storage. Intact fruits were placed in an 8L Pyrex container through which an air stream (900 mL min⁻¹) was passed for 4h. The resulting effluent was then passed through an ORBO-32 adsorption tube filled with 100 mg of

activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL of diethyl ether. The identification and quantification of volatile compounds was performed on a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector (GC-FID), using a cross-linked FFAP capillary column (50 m × 0.2 mm × 0.33 μm) into which a volume of 1 μL of the extract was injected in all the analyses. The oven program was set at 70 °C (1 min) and the temperature was first raised by 3 °C min⁻¹ to 142 °C and later by 5 °C min⁻¹ to 225 °C. It was then kept constant for 10 min at this later temperature. Helium was used as the carrier gas (42 cm s⁻¹), with a split ratio of 40:1. The injector and detector were held at 220 °C and 240 °C, respectively. Compounds were identified by comparing their respective retention indexes with those of standards and by enriching apple extract with authentic samples. Quantification was carried out by adding 25 μL of a 0.2% solution of butylbenzene (assay >99.5%, Fluka) as an internal standard. A GC-MS system (Hewlett-Packard 5890) was used for compound confirmation, using the same capillary column as in the GC analyses. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (42 cm s⁻¹), following the same temperature gradient program as described previously. Spectrometric data were recorded (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) and compared with those from the NIST HP59943C original library mass spectra. Results were expressed as μg kg⁻¹.

Sensory measurements

For consumer evaluation, the fruit samples removed from each atmosphere and during each storage period were kept in a room at 20 °C for 7 days. Twenty apples per treatment (atmosphere × storage period) were used for sensory analysis. Prior to sensory evaluation, half of each fruit was instrumentally analyzed in relation to its standard quality parameters. Three pieces (one per atmosphere) were placed on white plates and immediately presented to a tasting panel of 40 consumers who conducted a sensory evaluation of fruit for both storage periods. All 40 participants were the same for all treatments assessed. Consumers were volunteers from the staff working at the UdL-IRTA research institute and students from the University of Lleida. All the test participants were habitual (daily) apple consumers. Each piece was identified with a random three-digit code. The order of presentation of the three fruit parts presented on the white plate was randomized for each consumer. Mineral water was used as a palate

cleanser between samples. All evaluations were conducted in individual booths under white illumination and at room temperature. Each consumer assessed all three samples and was asked to indicate his/her degree of liking/disliking using a 9-point hedonic scale (1-dislike extremely to 9-like extremely). Sweetness, sourness, overall flavor, crispness, firmness and juiciness were also evaluated by means of a test in which the judges were asked to rank the samples in increasing order (from less to more) for each of the attributes considered. The samples could be retasted as often as required.

Standard quality parameter analyses

As explained in the previous paragraph, parts from twenty fruits per treatment were individually assessed for flesh firmness, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA) and skin color, both at harvest and after removal from cold storage (atmosphere \times storage period \times shelf-life period). Flesh firmness was measured on opposite sides of each fruit with a penetrometer (Effegi, Milan, Italy) equipped with an 11-mm diameter plunger tip; results were expressed in N. SSC and TA were measured in juice pressed from the whole fruit. SSC was determined with a hand refractometer (Atago, Tokyo, Japan) and results were expressed as % sucrose in an equivalent solution. TA was determined by titrating 10 mL of juice with 0.1 N NaOH to pH 8.1 using phenolphthaleine (1%), and results were given as g malic acid L⁻¹. Fruit epidermis color was determined with a portable tristimulus colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta Corp, Osaka, Japan) using CIE illuminant D₆₅ and with an 8 mm measuring aperture diameter. Skin color was measured at two points on the equator of each fruit that were 180° apart: one on the side exposed to sunlight (ES) and the other on the shaded side (SS). Hue angle was measured on both the side exposed to the sun and on the shaded side and the resulting values were respectively used as measurements of superficial and background color.

Statistical analysis

A multi-factorial design was used to statistically analyze the results. The factors considered were storage period, storage atmosphere, shelf-life period and replication. All data were tested by analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) applying the SAS program package (SAS, 1998). Means were separated by the LSD test at $p \leq 0.05$. For multivariate analysis, samples were characterized according to average measurements (instrumental analyses) or by taking average scores for all the consumers

(sensory analyses). Two principal component analysis (PCA) models were performed to provide an easy visualization of the complete data set in a reduced dimension plot. The first PCA model included the 6 samples corresponding to 19 weeks of storage and the second included the 6 samples stored for 30 weeks. Forty-five variables (volatile compounds) were considered in each case. The samples were characterized by their volatile compound emissions. Sample names were coded as described in the 'Plant material and storage conditions' section. The variables analyzed were labeled as specified in Table 1. Partial least square regression (PLSR) was used as a predictive method to relate consumer acceptability (Y) to a set of explanatory variables (X) which contains the volatile compounds, instrumental quality measurements and sensory attributes within a single estimation procedure. Unscrambler vers 6.11a software (CAMO, 1997) was used to develop these models. As a pre-treatment, data were centered and weighted using the inverse of the standard deviation of each variable in order to avoid the influence of the different scales used for the variables (Martens and Naes, 1989). Full cross-validation was run as a validation procedure.

3. Results and discussion.

Volatile compound emission at harvest

The volatile compounds identified and quantified at harvest are shown in Table 1. A total of 34 compounds were detected, of which 26 were esters (9 acetates, 5 propanoates, 7 butanoates, 4 hexanoates and 1 octanoate) and 8 alcohols. The esters 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate, hexyl 2-methylbutanoate, butyl hexanoate and hexyl butanoate and alcohols 2-methyl-1-butanol and 1-hexanol were, quantitatively the main compounds present. They accounted for 70% of the total volatile fraction. Emissions of 2-methylbutyl and hexyl acetates were related to higher concentrations of their alcohol precursors, as the production of 2-methyl-1-butanol and 1-hexanol paralleled that of their corresponding esters (Table 1). This contribution from the alcohol precursors confirmed previous reports for 'Fuji' (Lara et al., 2006), 'Gala' (Fellman et al., 2000) and 'Greensleeves' apples (Defilippi et al., 2000). Moreover, 2-methylbutyl acetate was reported as the predominant volatile compound in 'Fuji', in agreement with other authors (Fellman et al., 2000, Echeverría et al., 2004c).

In previous works, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutanoate acetate, ethyl hexanoate, and hexyl acetate were considered to be the compounds that most contribute to ‘Fuji’ flavor at harvest (Echevería et al., 2004c; Lara et al., 2006). These compounds also reportedly contribute to fresh-green and fruity odors (Flath et al., 1967; Dimick and Hoskin, 1982; Rizzolo et al., 1989; Young et al., 1996).

Table 1. Compounds identified using GC, retention index, codes used for PCA and PLS analyses and amount at harvest ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Compound	RI ^a	Code	Amount
Methyl acetate	834	mA	6.4
Ethyl acetate	898	eA	13.7
Ethanol	932	eOH	15.2
<i>t</i> -Butyl propanoate	964	tbPr	3.1
Propyl acetate	984	prA	6.6
Methyl butanoate	995	mB	nd
2-Methylpropyl acetate	1020	2mprA	4.2
1-Propanol	1036	1prOH	7.4
Ethyl butanoate	1043	eB	5.8
Ethyl 2-methylbutanoate	1059	e2mB	4.6
Butyl acetate	1082	bA	27.4
2-Methylpropyl propanoate	1086	2mprPr	nd
2-Methyl-1-propanol	1091	2m1prOH	2.2
2-Methylbutyl acetate	1131	2mbA	246.7
1-Butanol	1141	1bOH	6.1
Butyl propanoate	1148	bPr	21.0
Butyl 2-methylpropanoate	1149	b2mPr	nd
2-Methylpropyl butanoate	1165	2mprB	5.3
Pentyl acetate	1183	pA	9.0
2-Methylbutyl propanoate	1199	2mbPr	14.1
2-Methyl-1-butanol	1210	2m1bOH	53.7
D-Limonene	1215	D-lim	nd
2-Methylciclo pentanone	1218	2mciclona	nd
Butyl butanoate	1228	bB	5.4
Butyl 2-methylbutanoate	1240	b2mB	12.8
Ethyl hexanoate	1241	eHx	nd
Pentyl propanoate	1242	pPr	4.4
1-Pentanol	1253	1pOH	1.6
Hexyl acetate	1283	hxA	57.7
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1288	2mb2mB	nd
2-Heptanol	1326	2hOH	nd
Hexyl propanoate	1349	hxPr	3.1
6-Methyl-5-hepten-2one	1353	6m5hep2one	nd
1-Hexanol	1358	1hxOH	31.8
2-Methylpropyl hexanoate	1359	2mprHx	4.0
Butyl hexanoate	1423	bHx	34.8
Hexyl butanoate	1426	hxB	34.6
Hexyl 2-methylbutanoate	1436	hx2mB	97.5
Octyl acetate	1484	oA	2.4
2-Ethyl-1-hexanol	1494	2ehxOH	28.8
Pentyl hexanoate	1520	pHx	7.0
Hexyl hexanoate	1621	hxHx	26.2
Butyl octanoate	1623	bO	3.9
Hexyl octanoate	1854	hxO	nd

^a Kovats retention index in cross-linked FFAP column (Poole and Poole, 1993).

Standard quality parameters at harvest and after storage

Table 2 shows values for standard quality parameters in apples at harvest, and after cold storage plus periods of 1 or 7 days at 20 °C (simulating their commercial life and final quality on reaching potential consumers). In all cases, lower values for TA and Hue SS (indicating more yellowing on the epidermis) were found for stored fruit than freshly harvested apples (TA, LSD=0,27; Hue SS, LSD=7,93). These changes are consistent with the softening, decomposition of organic acids and modification of pigments, which are typically associated with fruit ripening. The values of the quality parameters at harvest have commercial importance as the initial maturity of the fruit is a key factor for successful storage. In this work, fruit values coincided with those recommended for this cultivar (Masseron et al., 1995).

Table 2. Standard quality parameters of ‘Fuji Kiku® 8’ apples at harvest and after storage under different conditions (ULO, ULO+2 weeks in air and ULO+4 weeks in air) plus 1 and 7 days at 20 °C.

			Firmness	SSC	TA	Hue	Hue					
			(N)	(%)	(g/L)	(SS)	(ES)					
AT HARVEST			74.8	16.0	3.7	99.9	38.2					
Storage Days												
Treatments (weeks) at 20 °C												
ULO	19	1	71.0	B	16.5	B	2.7	BC	80.4	B	41.0	C
		7	73.1	AB	16.3	BC	3.1	AB	76.2	BC	45.8	BC
	30	1	72.9	AB	15.8	C	3.2	A	77.5	BC	47.6	B
		7	65.3	CD	16.0	BC	2.8	B	78.7	B	49.4	AB
ULO+2w	19	1	68.1	BC	15.4	CD	2.8	B	87.3	AB	45.3	BC
		7	74.2	AB	15.8	C	3.2	A	78.0	B	43.1	BC
	30	1	72.5	AB	15.0	D	2.8	B	79.4	B	48.1	AB
		7	63.2	D	15.8	C	2.5	C	80.8	AB	53.1	A
ULO+4w	19	1	67.8	BC	14.9	D	2.1	D	88.7	A	43.7	BC
		7	69.1	BC	15.7	C	2.7	BC	86.5	AB	46.6	BC
	30	1	75.8	A	17.4	A	3.1	A	78.2	B	44.2	BC
		7	67.0	C	17.6	A	3.0	AB	69.9	C	41.7	C

Means followed by different capital letters for each quality parameter are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

One day after removal from 19-week storage, firmness and superficial red color (Hue ES) remained good in fruit exposed to the ULO+2w and ULO+4w conditions in comparison with fruit kept under ULO atmosphere conditions. However, SSC decreased in fruits subjected to the ULO+2w and ULO+4w treatments; fruits subjected to the ULO+4w atmosphere also showed lower values of TA than those stored in a ULO

atmosphere, in addition to a higher degree of yellowing, which was indicative of a more advanced stage of ripening. In general, fruits kept under ULO conditions had higher SSC levels than AIR fruits (Echeverría et al., 2004c). After 7 days of shelf-life, no significant changes were observed between the different atmospheres. After 30 weeks of storage (plus 1 day at 20 °C), the atmosphere did not seem to have any significant influence on fruit firmness, superficial color or background color. After 7 days at 20 °C, a similar retention of firmness was observed, regardless of the storage conditions. In contrast, extending the shelf-life period produced an increase in SSC and a reduction in Hue(SS) and Hue(ES) values in fruits subjected to the ULO+4w treatment. There was also a decline in TA levels in fruits subjected to the ULO+2w treatment, which indicated more advanced maturity stages in these fruits than in those subjected to ULO.

Volatile compound emission after cold storage

A total of 45 compounds were detected after cold storage compared with the 34 found at harvest. The compounds that appeared after cold storage but not at harvest were: the esters methyl butanoate, ethyl hexanoate, hexyl octanoate, 2-methylpropyl propanoate, butyl 2-methylpropanoate, heptyl 2-methylbutanoate, and 2-methylbutyl 2-methylbutanoate; the alcohol 2-heptanol; and D-limonene, 2-methylciclo pentanone and 6-methyl-5-hepten-2-one. The total straight-chain ester compounds were divided in 7 acetates, 3 propanoates, 4 butanoates, 4 hexanoates and 2 octanoates, while the total branched-chain esters comprised 2 acetates, 4 propanoates, 6 butanoates and 1 hexanoate. A further 12 alcohols were detected after the different storage periods (Table 1).

An increase in total emissions of volatile compounds was observed for ULO+2w and ULO+4w fruit with respect to samples stored in ULO, regardless of the storage and shelf-life periods (ULO: 3079 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ULO+2w: 4621.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ULO+4w: 4983.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Nevertheless, it was necessary to conduct a deeper study of the relationship between volatile compounds and the samples analyzed for different storage and shelf-life periods and also for each atmosphere. For this reason, two PCA models were run that considered all 45 volatile compounds emitted by 'Fuji' apples. The first included samples from fruit stored for 19 weeks (Figure 1A) and the second included samples subjected to 30 weeks of cold-storage (Figure 1B). The variances explained by the first two PCs were 76% and 77% for samples stored for 19 and 30 weeks, respectively. The

biplot for short-term storage (Figure 1A) revealed that 89% of the volatile compounds were located on the right hand side of the graph, which indicated a strong correlation with samples stored under ULO+2w and ULO+4w conditions after 1 day at 20 °C. A similar pattern was observed for samples subjected to long-term storage (Figure 1B). Both biplots showed that samples were separated over the first PC. It can also be observed that the shelf-life period was responsible for the main differences between the samples. This was especially detected in the case of samples stored for 30 weeks. We can consequently say that an extra period under AIR conditions after ULO storage increased the amount of the most volatile compounds with respect to ULO after 1 day at 20 °C. This would seem to suggest that the capacity of fruit to synthesize volatile compounds was modified by these atmospheres. However, this behavior was not observed after 7 days at 20 °C. Previous authors observed the negative influence of shelf-life on the production of the acetate compounds that most contribute to 'Fuji' flavor (Echeverría et al., 2004a).

After 1 day at 20 °C following 19 weeks of cold storage, the concentrations of the following straight-chain esters increased significantly in fruits exposed to the ULO+2w and ULO+4w atmospheres: butyl acetate, pentyl acetate, hexyl acetate, butyl butanoate, hexyl butanoate, butyl hexanoate, pentyl hexanoate and hexyl hexanoate, with respect to those stored in a ULO atmosphere. These compounds contribute a fruity and apple smell (Rizzolo et al., 1989; Dimick and Hoskin, 1982; Plotto, 1998). Straight-chain organic acid precursors are formed by the oxidation of fatty acids and/or via lipoxygenase activity. Both of these processes require oxygen and are presumably slowed down by ULO storage conditions (Brackmann et al., 1993). After 7 days at 20 °C following short-term storage (19 weeks), the concentrations of most straight-chain esters increased in line with the time that the fruits were stored in AIR. In the case of branched-chain esters, and regardless of the storage period, after 1 day at 20 °C, fruit stored under ULO+4w and ULO+2w conditions displayed higher concentrations than those stored under ULO conditions. It is also important to note that emissions of ethyl 2-methylbutanoate were greater in the case of fruit stored under ULO+2w and ULO+4w conditions after longer periods of cold storage (30 weeks) plus 7 days at 20 °C than in ULO-stored fruit after 1 day at 20 °C. It has been reported that ethyl 2-methylbutanoate is one of the main contributors to the flavor of 'Fuji Nagafu 6' (Echeverría et al., 2004a;

2004c), ‘Starking Delicious’ (López et al., 1998) and other ‘Delicious’ apples (Flath et al., 1967).

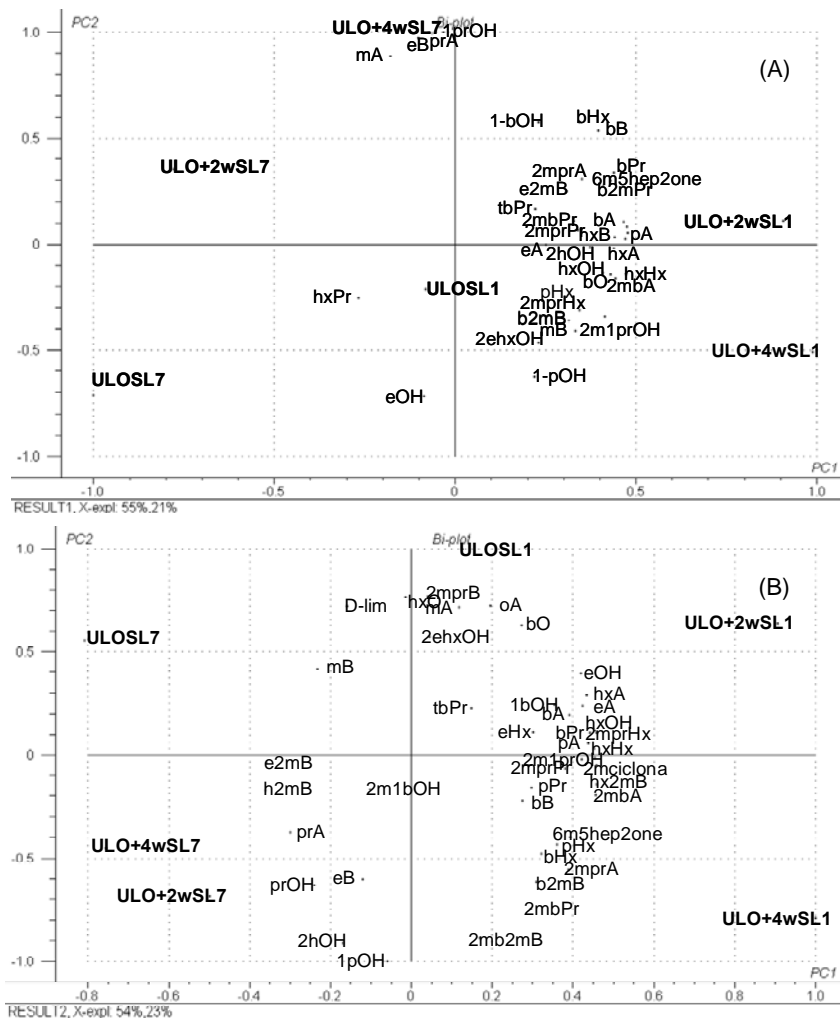


Figure 1. (A) Biplot (scores and loadings) corresponding to volatile compound data according to the PCA model for 'Fuji Kiku® 8' apples after 19 weeks of storage. (B) Biplot (scores and loadings) corresponding to volatile compound data according to the PCA model for 'Fuji Kiku® 8' apples after 30 weeks of storage. Aroma volatile compounds are coded as indicated in Table 1. Samples are labeled as described in the 'Material and Methods' section.

Much effort is made to identify the most important contributors to apple flavor in different apple varieties. Table 3 shows the evolution of the concentrations of the main contributors to ‘Fuji’ apple aroma reported by others authors (Echeverría et al., 2004a; 2004c). In this way, it is possible to analyze in depth whether concentrations increased with extra time in AIR after storage in a ULO atmosphere. From Table 3, it can be

generally concluded that after 7 days at 20 °C for both storage periods, the most efficient atmosphere for increasing the main volatile compounds was ULO+4w, whereas after 1 day at 20 °C, differences were found for each storage period. After 19 weeks of storage, the ULO+2w atmosphere helped to increase the amount of hexyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate and 2-methylbutyl acetate while ULO+4w was the most successful atmosphere for long-term storage. Quantitatively, the most abundant straight-chain ester was hexyl acetate (Table 3). From our results, we observed that the atmosphere was only effective for short storage periods, with ULO+2w and ULO+4w being the most efficient conditions after 1 and 7 days at 20 °C, respectively. No differences were found for long-term storage. Our results showed an inhibiting effect on the synthesis of hexyl acetate after lengthening the shelf-life period to 7 days at 20°C in the case of short-term storage (Table 3). This decrease in hexyl acetate with extended shelf-life confirms the findings of previous reports (Echeverría et al., 2004a) for ‘Fuji Nagafu 6’ apples. The inhibiting effect of shelf-life could be explained by insufficient substrate availability: substrate is necessary for aroma recovery after cold storage (Echeverría et al., 2002). The pool of available precursors may have been consumed earlier in the shelf life period. Straight-chain organic acid precursors are formed by β -oxidation of fatty acids and/or via lipoxygenase activity, both of which require oxygen and are presumably slowed down by ULO storage conditions (Lara et al., 2006).

Except in the case of 19-week storage, the ULO+4w atmosphere allowed the regeneration of ethyl butanoate with respect to ULO+2w and ULO. The same pattern was observed for ethyl hexanoate. Indeed, we should emphasize the absence of this compound in association with the ULO and ULO+2w atmospheres.

After 1 and 7 days at 20 °C (Table 3), the most quantitatively abundant branched-chain ester was 2-methylbutyl acetate. Following 19 weeks of cold storage and 1 day at 20 °C, an increase in the emission of this compound was observed throughout the extra period in AIR: the resulting value was greater for ULO+4w than for ULO+2w, and the latter value was greater than that for ULO conditions. After longer cold storage (30 weeks), an increase was observed with respect to the ULO atmosphere, but no differences were observed between the ULO+2w and ULO+4w atmospheres. After 7 days at 20 °C, no differences were found either between atmospheres or between storage periods. Generally speaking, and as observed in previous works (Echeverría et al., 2004a), increasing the shelf-life period resulted in inhibited 2-methylbutyl acetate

synthesis in ‘Fuji Nagafu 6’ apples. It has been suggested that 2-methylbutyl acetate is formed from L-isoleucine via 2-methyl-1-butanol (Fellman et al., 2000). Emissions of 2-methylbutyl acetate were generally consistent with those of its alcohol precursor (2-methyl-1-butanol), which was the most predominant alcohol after cold storage.

Furthermore, ethyl 2-methylbutanoate is considered to be the impact compound in the volatile profile in ‘Fuji’ apples. In general, we did not observe any significant atmosphere effect for this compound in either the storage or the shelf-life period except in the case of the ULO+2w conditions for short-term storage and 1 day after removal from cold storage. Its contribution is also notable in ‘Fuji Nagafu 6’ (Echeverría et al., 2004a) and ‘Starking Delicious’ (López et al., 1998) and other ‘Delicious’ apples (Flath et al., 1967).

It can generally be concluded that the extra period under AIR conditions helped to enhance the aroma profile, adding more intense attributes such as a ripe, fruity smell (Rizzolo et al., 1989; Flath et al., 1967; Young et al., 1996; Dimick and Hoskin, 1982).

Table 3. Compounds ($\mu\text{g kg}^{-1}$) that most contribute to ‘Fuji’ flavor.

Compounds	Days at 20°C	19 weeks			30 weeks		
		ULO	ULO+2w	ULO+4w	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Hexyl acetate	1	155.6 B	251.8 A	172.0 B	87.7 CD	119.0 BC	86.0 CD
	7	29.9 D	47.6 CD	93.6 C	24.8 D	43.2 CD	33.5 D
Ethyl butanoate	1	3.1 BC	3.1 BC	2.0 BC	nd	nd	1.5 BC
	7	1.6 BC	5.8 AB	6.9 A	0.8 C	3.0 BC	3.6 B
Ethyl hexanoate	1	nd	nd	nd	nd	nd	13.9 A
	7	nd	nd	5.4 C	nd	nd	10.9 B
2-Methylbutyl acetate	1	503.6 CD	779.0 B	1017.3 A	405.1 D	577.3 C	680.9 BC
	7	290.1 DE	469.2 CD	456.8 CD	194.2 E	299.6 DE	300.0 DE
Ethyl 2-methylbutanoate	1	15.5 BC	32.5 A	14.7 BC	10.3 BC	14.7 BC	7.9 C
	7	11.5 BC	13.7 BC	16.8 BC	16.7 BC	16.9 BC	18.8 B

Means followed by different capital letters for a given compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). nd =not detected

Acceptability and sensory attributes

As far as acceptability was concerned, there were no significant differences associated with the different atmospheres and storage periods (Table 4). With respect to flavor, fruits stored for short periods under ULO conditions registered lower scores than those subjected to ULO+2w and ULO+4w atmospheres. No significant differences were found between ULO+2w and ULO+4w. Moreover, we did not detect any influence of storage time. As regards the sweetness perceived by the consumers, all fruit received the same score for short term storage (19 weeks). However, in the case of long-term storage

(30 weeks) the ULO+4w atmosphere received the highest score, while fruit subjected to ULO and ULO+2w conditions scored lowest. For sourness, fruit kept under ULO+2w conditions scored the highest values for both storage periods. After longer periods (4 weeks) under AIR conditions there was a decrease in the perception of sourness; fruit kept under ULO conditions also received lower scores. Consumers are usually very sensitive to differences in fruit acidity, and recent studies have shown that differences as small as 0.8 g malic acid/L between two apples can be detected by a trained panellist (Harker et al., 2002). On the other hand, no differences in sourness were observed between the two storage periods. With respect to crispness and sensory firmness, both attributes showed the same pattern after 19 weeks of cold storage. The lowest scores were for fruit subjected to ULO+4w, while the most positive perceptions of crispness and sensory firmness corresponded to fruits subjected to the ULO+2w treatment. For the ULO+2w treatment, differences between the two storage periods were found, with lower values for long-term than for short-term storage. For juiciness, fruits stored for shorter periods were perceived as juicier than those subjected to longer-term storage under AIR conditions. In contrast, no significant differences in the perception of juiciness were found for fruit stored for 30 weeks.

Table 4. Global acceptability and sensory attributes of ‘Fuji Kiku® 8’ apples after 19 and 30 weeks in cold storage under different conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) after 7 days at 20°C.

Sensory attributes	ULO		ULO+2w		ULO+4w	
	19w	30w	19w	30w	19w	30w
acceptability	6.08 A	6.47 A	6.45 A	6.16 A	6.35 A	6.40 A
flavor	1.71 B	1.90 AB	2.17 A	1.95 AB	2.13 A	2.15 A
sweetness	1.88 B	1.94 B	1.98 B	1.73 B	2.12 AB	2.34 A
sourness	1.95 AB	1.80 B	2.18 A	2.13 AB	1.87 B	2.07 AB
crispness	2.03 AB	2.06 AB	2.23 A	1.81 B	1.75 B	2.14 A
firmness	1.93 B	1.97 AB	2.24 A	1.93 B	1.87 B	2.09 AB
juiciness	1.85 B	2.11 AB	1.99 AB	1.96 AB	2.16 A	1.93 AB

Means followed by different capital letters for each sensory attribute are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

PLS regression model of acceptability according to volatile compound emission, instrumental quality measurements and sensory attributes.

A PLSR model was developed with the aim of identifying the main variables influencing consumer acceptability. The model considered volatile compounds, instrumental quality measurements and sensory attributes as X variables and acceptability as the Y variable. This procedure allowed a rapid assessment of relationships between the dependent variable (Y) and a set of potentially explanatory

variables (X). The validation step indicated that only one PLS factor was relevant in the model. The percentage of explained variance involving this factor was 86% of total variability (Figure 2).

Higher acceptability scores were associated with fruit exhibiting higher emissions of the straight-chain esters methyl acetate, octyl acetate and ethyl hexanoate and the branched-chain esters 2-methylpropyl propanoate, butyl 2-methylpropanoate and ethyl 2-methylbutanoate. Within the alcohol group, we concluded that 2-methyl-1-butanol had the greatest influence on acceptability, followed by 1-propanol, 1-butanol and 2-ethyl-1-hexanol. Of these, ethyl hexanoate and ethyl 2-methylbutanoate stood out for their contribution to the aroma profile of 'Fuji' apples (Echeverría et al., 200a, 2004c). It is important to highlight that ULO+4w atmosphere caused an increase of the amount of ethyl hexanoate (Table 3) as well as of 2-methylpropyl propanoate and butyl 2-methylpropanoate (data not shown). We had also reported the influence of some volatile compounds on consumer acceptability in previous works (Echeverría et al., 2004b). The combined results suggest that concentrations of certain specific volatile compounds are more important than total aroma volatile emissions in determining overall fruit acceptability. The most important volatile compound that showed the lowest weight on acceptability was ethanol. Ethanol accumulation during storage leads to a disproportionate synthesis of ethanol-derived esters (Mattheis et al., 1991). Because of their low organoleptic thresholds (Flath et al., 1967), disproportionate amounts of these volatiles may be responsible for some of the off-flavors attributed to fruit stored under hypoxic-controlled atmosphere (CA) conditions (Rudell et al., 2002).

The instrumental quality measurements that positively influenced acceptability were TA and SSC. This result largely confirmed the findings reported by Alavoine et al. (Alavoine et al., 1990) and Echeverría et al. (2004b). There were discrepancies between our study and theirs with respect to fruit firmness and Hue on the shaded side. They reported the influence to be positive in these areas, but according to our results these variables had not a positive influence. The weight of the variable Hue (ES) indicated that when red color was lower, fruit acceptability decreased. This result was in accordance with Echeverría et al. (2004b) and Crasweller and Hollender (1989) who reported that red color was the most important instrumental quality parameter influencing apple purchasing patterns.

The sensory attributes that most influenced acceptability were flavor (with the greatest influence) and juiciness. These results are in agreement with Péneau et al. (2007) who showed that freshness, together with taste and aroma, was a decisive attribute for selecting apples. They related freshness to crispness, juiciness, aroma and liking. Figure 2 shows that some sensory results did not perfectly reflect the corresponding instrumental measurements. Sweetness had a greater influence on acceptability than SSC. This could be due to the fact that perceptions of sugar content can be accentuated by the presence of acids or because some aroma compounds contribute sweet notes to flavor (Echeverría et al., 2004a; Malundo et al., 1995; Baldwin et al., 1998).

In summary, the extra period in AIR conditions allowed the regeneration of the characteristic esters for this variety that contribute to fresh-green and fruity odors. Acceptability was mainly determined for some volatile compounds, acidity and sugar content as well as for the perceived flavor for consumers.

4. Acknowledgements

R. Altisent is a recipient of a grant from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). This work was supported through project RTA2005-00050-00-00 and financed by the INIA.

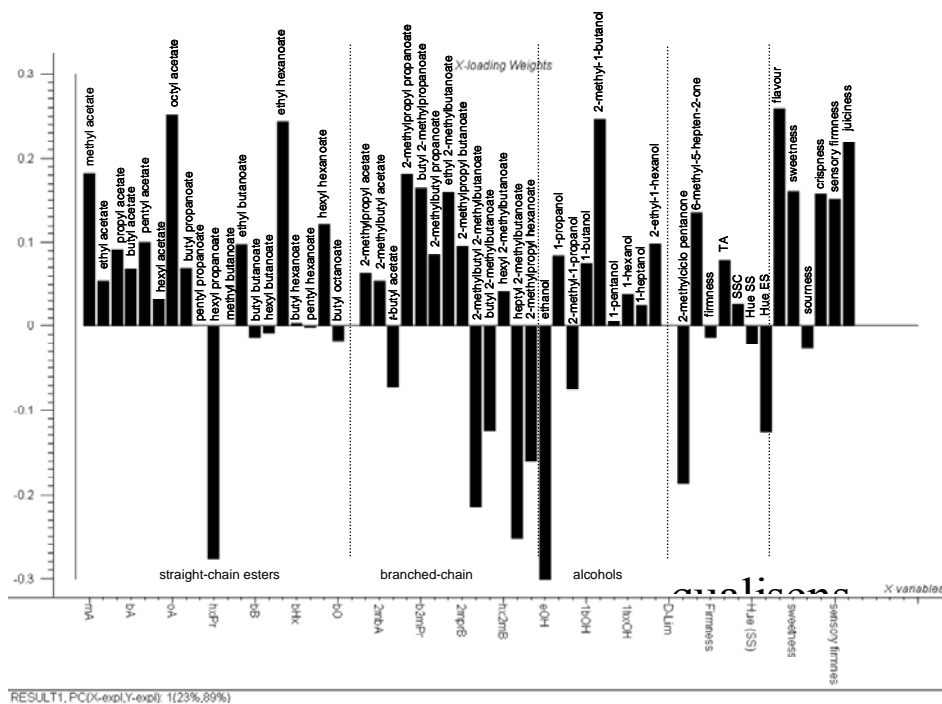


Figure 2. Loading weight plot of PC1 vs PC2 from a PLSR model of volatile compounds, standard quality parameters and sensory attributes (*X* variables) vs. consumer acceptability (*Y* variable) for ‘Fuji Kiku® 8’ apples after cold storage and 7 days at 20°C. Aroma volatile compounds are coded as indicated in Table 1. Samples are labeled as described in the 'Material and Methods' section.

5. References

Alavoine, F.; Crochon, M.; Bouillon, C. 1990. Practical methods to estimate taste quality of fruit : how to tell it to the consumer. *Acta Horticulturae*, 259, 61-68.

Andani, Z.; MacFie, H. J. H. 1998. Consumer preferences, expectations and quality perceptions of dessert apples. *Postharvest News and Information*, 9, 39-44.

Baldwin, E. A.; Scott J. W.; Einstein, M. A.; Malundo, T. M. M; Carr, B. T.; Shewfelt, R. L.; Tandon, K. S. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 12, 906-915.

Brackmann, A. 1990. Possibilities of aroma improvement in apples during CA storage. In *XXIII International Horticultural Congress*, ISHS, Firenze, Abstracts; Vol. 2, p. 3316.

Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F. 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apple after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.

- CAMO ASA.** 1997. Unscrambler Users Guide, ver. 6.11^a. Programme Package for Multivariate Calibration. Trondheim, Norway.
- Cliff, M. A.; Lau, O. L.; King, M. C.** 1998. Sensory characteristics of controlled atmosphere and air-stored 'Gala' apples. *Journal of Food Quality*, 21, 239-249.
- Crassweller, R. M.; Hollender, R. A.** 1989. Consumer evaluations of 'Delicious' apples strains. *Fruit Varieties Journal*, 43, 139-142.
- De Pooter, H. L.; Montens, J. P.; Willaert, G. A.; Dirinck, P. J.; Schamp, N. P.** 1983. Treatment of Golden Delicious apples with aldehydes and carboxylic acids: effect on the headspace composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 813-818.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2005. Relationships of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C.** 1982. Review of apple flavour. State of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 387-409.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Temperature of hypoxic treatment alters volatile composition of juice from Fuji and Royal Gala apples. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 71-83.
- Eccher-Zerbini, P. E.; Pianezzola, A.; Grassi, M.** 1999. Poststorage sensory profiles of fruit of five apple cultivars harvested at different maturity stages. *Journal of Food Quality*, 22, 1-17.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2002. Effect of harvest date and storage conditions on quality and aroma production of 'Fuji' apples. *Food Science and Technology International*, 8, 351-360.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004a. Aroma of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold-storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G.; Lara, I.; Fuentes, T.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004b Assessment of relationships between sensory and instrumental quality of CA-stored 'Fuji' apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004c. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of 'Fuji' apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 84, 5-20.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavour compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.

- Harker, F. R.; Marsh, K.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverria, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.
- Lidster, P. D.; Lightfoot, H. L.; McRae, K. B.** 1983. Production and regeneration of principal volatiles in apples stored in modified atmospheres and air. *Journal of Food Science*, 48, 400-410.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by 'Starking Delicious' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 634-643.
- López, M.; Lavilla, T.; Graell, J.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Effect of different CA conditions on aroma and quality of Golden Delicious apples. *Journal of Food Quality*, 22, 583- 597.
- López, M.; Lavilla, T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- Malundo, T. M. M.; Shewfelt, R. L.; Scott, J. W.** 1995. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acids levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 103-110.
- Mantinger, G.** 1998. La coltivazione della mela 'Fuji' in Alto Adige. *Rivista di Frutticoltura*, 6, 25-29.
- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley J. and Sons Eds.; Chichester, UK; pp. 116-165.
- Masseron, A.; Trillot, M.; Mathieu, V.; Tronel, C.** 1995. *Fuji*. CTIFL.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- Meberg, K. R.; Haffner, K.; Rosenfeld, H. J.** 2000. Storage and shelf-life of apples grown in Norway I. Effects of controlled atmosphere storage on 'aroma'. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 9-16.
- Paz, O.; Janes, H.; Prevost, B.; Frenkel, C.** 1982. Enhancement of fruit sensory quality by postharvest applications of acetaldehyde and ethanol. *Journal of Food Science*, 47, 270-276.
- Péneau, S.; Brockhoff, P. B.; Hoehn, E.; Escher, F.; Nuessli, J.** 2007. Relating consumer evaluation of apple freshness to sensory and physico-chemical measurements. *Journal of Sensory Studies*, 22, 313-335.

- Pesis, E.; Marinansky, R.; Avissar, I.** 1989. Effect of prestorage treatments with acetaldehyde vapors or anaerobic conditions on volatiles accumulation during storage of various fruits. *Acta Horticulturae*, 258, 661-667.
- Plotto, A.** 1998. Instrumental and sensory analysis of 'Gala' apple (*Malus domestica*, Borkh) aroma. Unpublished PhD Thesis. Oregon State University: Corvallis, Oregon, United States; pp.193.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Poole, C. L.; Poole, S. K.** 1993. The Column in Gas Chromatography. In *Chromatography Today*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp. 176-181.
- Ravaioli, A.** 1998. Azioni promozionali e valorizzazione commerciale delle mele 'Fuji'. *Rivista di Frutticoltura*, 6, 30-32.
- Rizzolo, A.; Polesello, A.; Teleky-Vamosy, G. Y.** 1989. CGC/Sensory analysis of volatile compounds developed from ripening apple fruit. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12, 824-827.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wylie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.
- Sanz, C.; Olías, J. M.; Pérez, A. G.** 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of fruits and vegetables*; Tomás-Barberán, F.A., Robins, R.J., Eds.; Clarendon Press: Oxford; pp. 125-155.
- Sarrazin, C.** 1997. Pommes et poires. Informer le consommateur sur le nom des variétés. *Cahier Commercialisation Mai*; Toulouse, France. p 4-5.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Song, J.; Bangerth, F.** 1996. The effect of harvest date on aroma compound production of 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 259-269.
- Stainer, R.; Giuliani, G.; Yussef, J.; Toffolutti, B.** 1996. Caratteristiche qualitative e gradimento dei consumatori di nuove varietà di melo. *Rivista di Frutticoltura*, 11, 43-46.
- Stebbins, R. L.; Duncan, A.; Compton, C.; Duncan, D.** 1991. Taste ratings of new apple cultivars. *Fruit Varieties Journal*, 45, 37-44.
- Stebbins R.L.** 1992. États-Unis Pomme: nouvelles variétés nouveaux goûts. *L'Arboriculture fruitière*, 452, 44-49.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.

CAPÍTULO 2

Verification of the aroma regeneration influence on consumer acceptance in 'Fuji' apples over two seasons.

Rosa Altisent, Jordi Graell, Isabel Lara, Luisa López y Gemma Echeverría
Enviado a: *Food Science and Technology International*

Abstract

Over two subsequent seasons, emission of volatile compounds, consumer acceptability, flesh firmness and SSC:TA ratio were analyzed in 'Fuji' apples after a period of cold air storage following ultra low oxygen storage. In both seasons, apples were harvested at the same maturity stage and stored for 19 or 30 weeks at 1 °C and 92 % relative humidity under an ultra low oxygen atmosphere (1% O₂:1% CO₂) or under an ultra low oxygen atmosphere followed by different periods (2 or 4 weeks) in cold air. The results, for both seasons, revealed that the extra weeks under cold air storage helped to increase the emission of some volatile compounds, including those characteristic volatile compounds for the variety. Analogous pattern was observed for both seasons, although differences were experimented on their concentration. This extra period under air did not have a negative effect on quality parameters and as a result, fruits were more liked by consumers.

Keywords: acceptance, regeneration, seasonal variability, standard quality parameters, ULO atmosphere, volatile compounds.

1. Introduction

In recent years, ‘Fuji’ apples (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) have become very popular and have captured part of the market from more traditional varieties. This fruit has distinctive sensory characteristics, particularly with regard to its flavor and crunchy texture, and it is also well suited to postharvest storage (Echeverría et al., 2004a).

Over the years, research on postharvest storage has largely focused on maintaining appearance and texture of fruits and vegetables, with relatively little consideration of flavor and aroma. Previous studies have demonstrated that determining eating quality for different apple cultivars based on the usual parameters: skin color, calibre, total soluble solids, and titratable acidity, may not be sufficient to achieve the optimal sensory quality sought by consumers (Echeverría et al., 2004a; Mehinagic et al., 2006; López y col., 2007). Another aspect of this problem is that breeding programs have generally sought to enhance attributes required to bear shipping and long-term storage and that favor visual appeal, and have sometimes done this at the expense of fruit flavor and aroma (Goff and Klee, 2006; Tieman et al., 2006; Whitaker, 2008). However, flavor and aroma play a key role when producers want to get extra value out of their products, because consumer acceptance of produce is markedly influenced by these attributes. Therefore, it is important to optimize factors affecting fruit quality for consumption and to satisfy both producers and consumers who are increasingly concerned about perceived deficiencies in the sensory quality of the fruit that they purchase (Echeverría et al., 2004b, 2004c).

Apple fruits are commonly stored for up to 6-8 months in cold rooms, although the length of storage depends on the cultivar. From a commercial point of view, the best technique for maintaining fruit quality and reducing the incidence of physiological disorders is the controlled atmosphere (CA) with low or ultra-low oxygen (Graell et al., 1997; López et al., 2000). It is generally accepted that CA storage extends the postharvest life of most apple cultivars, based on the visual appearance and physicochemical characteristics (flesh firmness, soluble solids content, acidity), but its effect with respect to conserving fruit flavor is not always so clear. Flavor and aroma are generally supposed to be negatively influenced by storage under CA (Beaudry, 1999). Various authors have detected a decline in some volatile compounds associated with CA storage, especially with low O₂ and/or high CO₂ (Mattheis et al., 1991, 1995; Fellman et al., 2000, 2003; Plotto et al., 2000; Aaby et al., 2002; Echeverría et al.,

2004b; López et al., 2007), but there can also be an increase in volatiles when fruits are subsequently stored in a regular atmosphere (Plotto et al., 2000; Fellman et al., 2003; Brackmann et al., 1993; Lavilla et al., 1999; Altisent et al., 2008). Reduced emissions of aroma volatiles from apples have been reported to influence consumer acceptability (Brackmann et al., 1993; Lavilla et al., 1999; Altisent et al., 2008).

Previous works have demonstrated that an extra period of four weeks under air after ultra low oxygen storage helped to increase the concentration of some volatile compounds and specifically of those that most contribute to ‘Fuji’ flavor (Altisent et al., 2008). Moreover, this extra period did not affect negatively the quality parameters such as firmness and acidity. With these results, our group considered essential to prove the effect of this regeneration potential over two seasons owing to climatic factors have been shown to play an important role in subsequent ripening of apple fruit. Indeed, previous works in ‘Fuji’, ‘Golden Delicious’ and ‘Granny Smith’ apples have demonstrated that apples displayed different aroma production in two consecutive seasons (Echeverría et al., 2004b; López et al., 1998). Particularly, ‘Fuji’ apples certainly displayed both qualitative and quantitative differences in their production of volatile compounds over the two successive seasons, despite receiving the same pre- and postharvest treatments (Echeverría et al., 2004a).

The aim of this work was to establish whether a period of cold air storage after ULO storage causes an increase in the main volatile compounds found in this variety without loss of firmness, acidity and solid soluble content, as - if so - this would help to improve the sensory acceptance of the fruit. Due to seasonal variability, we want to verify the repeatability of the results over two years. Establishing such a relationship would make it possible to offer advice for applying appropriate technology that would help to enhance the flavor of fruit provided by the apple industry.

2. Materials and Methods

Plant material and storage conditions

‘Fuji Kiku[®] 8’ fruits were harvested in 2005 (FS; first season) and 2006 (SS; second season) at commercial maturity: 180 and 182 days after full bloom (dafb), from 4 and 5 year-old trees, respectively. The trees were grown on M-9 EMLA rootstock at the IRTA-Experimental Station, Lleida (NE Spain). FS fruits showed the following

values for maturity parameters: starch index 5.5 (on a 1-10 scale); average flesh firmness 74.1 N; soluble solids content (SSC) was 16.1 g 100g of fresh weight (FW)⁻¹; titratable acidity (TA) was 3.5 g malic acid L⁻¹; and average background color (a*+b*) 25.6. The corresponding values for SS fruits were: starch index 6.3; average flesh firmness, 69.4 N; SSC was 16.3 g 100g of fresh weight (FW)⁻¹; TA was 2.9 g malic acid L⁻¹; and average background color (a*+b*) was 27.2. There were therefore no significant differences in values for the two seasons at harvest, except in the case of acidity values, which were slightly lower in the second season. Maturity stage at harvest could be considered similar for the two seasons as no significant differences were observed in the starch index or in background color, which are the best maturity indicators for 'Fuji' apples (Echeverría et al., 2004b).

Immediately after harvest, 3 lots of 100 kg of apples per season were selected for uniformity and the absence of defects and stored at 1 °C and 92 % relative humidity in an ultra low oxygen (ULO) atmosphere (1% O₂:1% CO₂). One lot remained under ULO conditions for the whole 19 or 30 week (ULO) period. A second lot was kept for either 17 or 28 weeks under ULO conditions and then stored for 2 weeks under cold air (ULO+2w) conditions. The third lot was kept for either 15 or 26 weeks under ULO conditions followed by a further 4 weeks under cold air (ULO+4w) conditions. Volatile compound emission, quality parameters and consumer acceptability were measured at harvest and after removal from storage plus 7 days at 20 °C.

Quality parameter analyses

Fifteen fruits per treatment (season × storage conditions × storage period) were individually assessed for flesh firmness, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), starch index and background color. Flesh firmness, SSC and TA were analyzed both at harvest and after removal from cold-storage, while starch index and background color were only measured at harvest. Flesh firmness was measured with a Effegi penetrometer (FT 327; Effegi, Alfonsine, Italy) fitted with 11 mm plunger on two opposite surfaces in the equatorial zone of the apples; results were expressed in newtons (N). SSC and TA were measured in juice pressed from the whole fruit. SSC was determined with a hand-refractometer (Atago, Tokyo, Japan), and the results were expressed as % sucrose in an equivalent solution. To determine TA, 10 mL of pulp juice was diluted with 10mL of water and titrated with 0.1 N NaOH solution up to pH 8.2

using phenolphthaleine (1%), and expressing the results as g malic acid L⁻¹. Fruit color was determined with a portable tri-stimulus colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta Corp, Osaka, Japan) using CIE illuminant D₆₅ and an 8 mm diameter measuring aperture. Skin color was measured on the equator of each fruit on the shaded side and a*+b* parameter was used as measurement of background color in the fruits. Starch index was determined by dipping cross-sectional fruit halves in an iodide solution (15 g KI + 6 g I₂ per litre) for 30 s; starch hydrolysis was rated using a 1-10 scale (1= full, 10= no starch).

Chemicals

The chemicals obtained were of the highest quality available and, unless otherwise indicated, were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ethyl acetate, *t*-butyl propanoate, propyl acetate, 1-propanol, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, pentyl acetate, 2-methyl-1-butanol, hexyl acetate, 1-hexanol, hexyl 2-methylbutanoate and 2-ethyl-1-hexanol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was purchased from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain). 2-methylpropyl acetate was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain).

Analysis of volatile compounds

Eight kilograms of apples (2 kg/replicate × 4) per treatment (season × storage conditions × storage period) were selected for volatile compound analysis both at harvest and after removal from storage. Intact fruits were placed in an 8-L Pyrex container through which an air stream (900 mL min⁻¹) was passed for 4 h. The resulting effluent was then passed through an adsorption tube (ORBO-32™; SUPELCO, Bellefonte, PA) filled with 100 mg of activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL of diethyl ether. Identification and quantification of the volatile compounds was performed on a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector (GC-FID), using a cross-linked free fatty acid as the stationary phase (FFAP; 50 m × 0.2 mm i.d. × 0.33 μm) into which a volume of 1 μL of the extract was injected in all analyses. The oven program was set at 70 °C (1 min) and the temperature was first raised by 3 °C min⁻¹ to 142 °C and later by 5 °C min⁻¹ to 225 °C. It was then kept at this second temperature for a further 10 min. Helium was used as

the carrier gas (42 cm s^{-1}), with a split ratio of 40:1. The injector and detector temperatures were held at $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $240 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. A second capillary column (SGE, Milton Keynes, UK) with 5% phenyl polysilphenylene-siloxane as the stationary phase (BPX5, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$) was also used for compound identification under the same operating conditions as described above. Compounds were identified by comparing their respective retention indexes with those of standards and by enriching the apple extract with authentic samples. Quantification was carried out by adding $25 \text{ }\mu\text{L}$ of a 0.2% solution of butylbenzene (assay >99.5%, Fluka) as an internal standard. A GC-MS system was used for compound confirmation, using the same capillary column as in the GC analyses. Analysis was carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a 5973N mass selective detector. Mass spectrometric data were collected in full scan. Scan ranged from 30-500 amu. The scan rate was 3.1 scans s^{-1} . Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (42 cm s^{-1}), following the same temperature gradient program as described previously. Spectrometric data were recorded (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) and compared with those from the NIST HP59943C original library mass spectra. Results were expressed as micrograms per kilogram.

Sensory assessment

For consumer evaluation, fruit samples removed from each atmosphere and storage period were stored at $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days. Fifteen apples per treatment (season \times storage conditions \times storage period) were used for sensory analysis. Prior to evaluation, on each fruit to be used for the consumer test and after flesh firmness were measured, two longitudinal wedges were instrumentally analyzed in relation to its standard quality parameters as explained in the 'Quality parameter analyses' section; the rest of the fruit was divided in pieces and used for consumer evaluation. Three fruit samples (one per atmosphere) were placed on white plates and immediately presented to a tasting panel of 50 consumers for sensory evaluation; evaluations were obtained for both storage periods. The tasting panel was the same for all the treatments assessed. The fruit tasters were volunteers from staff working at the UdL-IRTA research institute and students from the University of Lleida. All participants were regular apple consumers. Each piece was identified by a random three-digit code. The order of presentation of the three pieces presented on the white plate was randomized for each taster. Mineral water was used as a palate cleanser between tastings. All evaluations were conducted in individual

booths under white illumination and at room temperature. Each taster assessed all three samples and was asked to indicate his/her degree of liking/disliking using a 9-point hedonic scale (1-dislike extremely to 9-like extremely). The samples could be retasted as often as desired.

Statistical analyses

A multi-factorial design was used to statistically analyze the results. The factors considered were storage period, storage atmosphere and season. All data were tested by analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) using the SAS program package (SAS, 1988). Means were separated by the LSD test at $p \leq 0.05$. For multivariate analysis, samples were characterized according to average values for the parameters assessed (volatile compounds and acceptability values). Two principal component analyses (PCA) of the samples were developed after cold storage, which provided an easy visualization of the complete data set in a reduced dimension plot. The first PCA model included the 6 samples corresponding to the 2005/2006 season (FS) and the second included the 6 samples from the 2006/2007 season (SS). Unscrambler vers. 7.6a software was used to develop these models (CAMO, 1997). As a pre-treatment, data were centered and weighted using the inverse of the standard deviation of each variable in order to avoid the influence of the different scales used for the variables (Martens and Naes, 1989). Full cross-validation was run as a validation procedure.

3. Results and Discussion

Quality parameters after cold-storage for two successive seasons.

Various authors have focused on how to cause a regeneration of volatile compounds emitted by apples stored under controlled atmosphere by different treatments (Paz et al., 1982; De Pooter et al., 1983; Pesis et al., 1989; Brackmann, 1990; Dixon and Hewett, 2001; Mattheis et al., 2005), but the literature says little about their influence on standard quality. It would therefore seem relevant to demonstrate the influence of the regeneration process applied in this work (involving an additional period of cold air storage after ULO storage) on quality parameters which may otherwise decline during prolonged storage. Our experiment particularly focused on values after 7 days of storage at 20 °C in order to simulate commercial shelf life and the final quality when fruits reach potential consumers. Firmness and the SSC:TA ratio

were evaluated in order to establish whether there were significant differences between atmospheres for the two consecutive seasons. After long term storage, fruit from the SS retained its firmness better than that from FS (Figure 1A), with fruit firmness values remaining above commercial limits in both seasons (Masseron et al., 1995). Overall, no significant differences were found between atmospheres on fruit firmness. These results are very positive, because texture influences consumer acceptability. In fact, texture is as important as taste and flavor in influencing consumer preferences and choices involving many fruits. Furthermore, fruit texture is among the primary attributes that determine how convenient fruits are to handle and eat (Harker and Johnston, 2008).

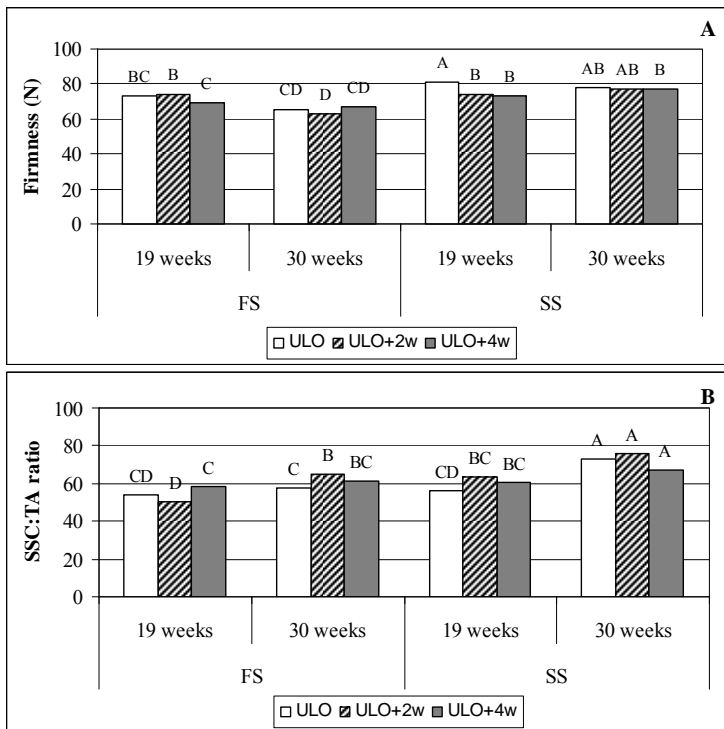


Figure 1. Firmness (labeled 1A) and SSC:TA ratio (labeled 1B) after cold storage for both seasons (FS and SS) of 'Fuji Kiku' 8' apples. Means with different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

Several researchers have established that consumer acceptability is closely related to SSC, TA and the SSC:TA ratio in various products including kiwis, peaches, cherries, grapes and oranges (Crisosto and Crisosto, 2002; Iglesias and Echeverría, 2009). Some researchers also concluded that consumers are more sensitive to the SSC:TA ratio than to SSC. From Figure 1B, we observe that there were no significant

differences between the two seasons in terms of short-term storage but that after long-term storage, SS fruit presented higher values for this ratio. Generally speaking, no significant differences were observed among the different storage conditions, and the extra period of cold air storage did not have a negative effect on the SSC:TA ratio.

Volatile compound emission at harvest for two successive seasons.

In order to establish the volatile profile at harvest, we compared volatile compounds emitted by fruits in the two successive seasons. The volatile compounds identified and quantified at harvest are shown in Table 1. A total of 34 volatile compounds were detected in the first season, with 26 esters and 8 alcohols. For the SS, some variations in the number of esters were detected. Related to the amount of total volatile compounds, the emission was higher for the first season (FS=808.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$; SS=495.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LSD= 140.6). Table 1 can be analyzed either quantitatively or qualitatively. In quantitative terms, the most important aroma volatile compounds were 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate. These three compounds contributed 50 and 55% of total aroma in FS and SS, respectively. From a qualitative point of view, we should take note that it is not possible to directly measure absolute concentrations of volatiles at the levels required to interact at the human receptor level. Odor thresholds in a given matrix have long been shown to be a useful tool for evaluating the odor activity of a volatile organic compound. A correlation between the concentration of a given volatile in the food itself and the odor threshold of the odorant has been proposed as a useful tool for estimating its odor contribution within the entire food volatile set. This ratio of concentration to odor threshold has been termed 'aroma value' or 'odor unit'. If the log odor unit of a given volatile compound is greater than 0, the compound could contribute to the odor, but if it is much less than 0, the compound does not make a significant contribution to total odor (Buttery, 1993). In the present study, we calculated the log odor units of the aroma volatiles present in 'Fuji' apples at harvest for both seasons (Table 1) according to odor thresholds presented in previous works (López et al., 2007). From our results, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate had positive log odor units for both seasons and were therefore likely to contribute to 'Fuji' flavor by intensifying more fruity, apple-like and fresh-green aromas at harvest (Dimick and Hoskin, 1982; Echeverría et al., 2004b; Wang et al., 2005).

Table 1. Amount of volatile compounds emitted ($\mu\text{g kg}^{-1}$), retention index and codes using for PCA analyses by 'Fuji Kiku[®] 8' apples at harvest for two seasons (FS, first season; SS, second season). Positive \log_{10} odor units in brackets.

Compounds	RI ₁ ^a	RI ₂ ^b	Code	OTH ^c	FS	SS
Methyl acetate	854	-	mA	8300(a)	6.4 a	11.7 a
Ethyl acetate	882	609	eA	13500 (b)	13.7 b	33.8 a
Ethanol	912	-	etOH	62450(c)	15.2 a	21.3 a
Tert-butyl propanoate	928	717	tbPr	19(a)	3.1 b	10.4 a
Propyl acetate	945	649	prA	2000(d)	6.6 a	8.5 a
Methyl butanoate	955	656	mB	76(e)	nd	nd
2-Methylpropyl acetate	976	691	2mprA	65(f)	4.2 a	3.3 a
1-Propanol	992	-	1prOH	9000(g)	7.4 a	5.2 a
Ethyl butanoate	1002	803	eB	1(c)	5.8 a (1.7)	1.3 b (1.0)
Propyl propanoate	1008	809	prPr	57(g)	nd	2.2
Ethyl 2-methylbutanoate	1015	845	e2mB	0.006 (f)	4.6 a (2.9)	3.7 a (2.8)
Butyl acetate	1040	813	bA	66(d)	27.4 a	28.4 a
2-Methylpropyl propanoate	1046	865	2mprPr	not found	nd	1.0
2-Methyl-1-propanol	1054	996	2mprOH	250 (h)	2.2 a	1.8 a
2-Methylbutyl acetate	1096	876	2mbA	11(f)	246.7 a (1.4)	170.7 a (1.2)
1-Butanol	1119	626	1bOH	500(g)	6.1 a	11.0 a
Butyl propanoate	1123	910	bPr	25(g)	21.0 a	2.4 b
Butyl 2-methylpropanoate	1129	1009	b2mPr	80(e)	nd	1.9
2-Methylpropyl butanoate	1140	954	2mprB	not found	5.3 a	nd
Pentyl acetate	1161	914	pA	43(d)	9.0 a	4.7 b
2-Methylbutyl propanoate	1180	950	2mbPr	19(a)	14.1 a	3.1 b
2-Methyl-1-butanol	1199	667	2mbOH	250(c)	53.7 a	16.2 b
Butyl butanoate	1218	1000	bB	100(e)	5.4 a	3.8 a
Butyl 2-methylbutanoate	1235	1042	b2mB	17(e)	12.8 a	4.4 b
Ethyl hexanoate	1239	1002	eHx	1(f)	nd	nd
Pentyl propanoate	1247	969	pPr	not found	4.4 a	nd
1-Pentanol	1262	688	pOH	4000(h)	1.6 a	1.2
Hexyl acetate	1292	1015	hxA	2(h)	57.7 a (1.5)	73.0 a (1.6)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1300	1106	2mb2mB	not found	nd	2.4
2-Heptanol	1350	1198	2hpOH	not found	nd	4.2
Propyl hexanoate	1353	1099	prHx	not found	nd	1.0
Hexyl propanoate	1379	1109	hxPr	8(i)	3.1 a	5.2 a
1-Hexanol	1392	869	1hxOH	500(h)	31.8 a	7.6 b
2-Methylpropyl hexanoate	1399	1153	2mprHx	- not found	4.0 a	1.2 b
Butyl hexanoate	1473	1196	bHx	700(e)	34.8 a	15.7 b
Hexyl butanoate	1477	1197	hxB	250(f)	34.6 a	9.4 b
Hexyl 2-methylbutanoate	1488	1239	hx2mB	6(e)	97.5 a (1.2)	21.5 b (0.6)
Octyl acetate	1549	1215	oA	not found	2.4 a	nd
2-Ethyl-1-hexanol	1565	1031	2ehxOH	270000(j)	28.8 a	3.7 b
Pentyl hexanoate	1590	1293	pHx	not found	7.0 a	2.9 b
Hexyl hexanoate	1687	1392	hxHx	64000 (k)	26.2 a	9.4 b
Butyl octanoate	1690	1394	bO	not found	3.9 a	nd
Hexyl octanoate	1840	1707	hxO	not found	nd	nd

^a Retention index in cross-linked FFAP column (Poole and Poole, 1993). ^b Retention index in BPX5 column (Poole and Poole, 1993). ^c Odour threshold ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in water reported in ref (a) (Schnabel y col., 1988), (b) (Takeoka y col., 1992), (c) (Rychlik y col., 1998), (d) (Takeoka y col., 1996), (e) (Takeoka y col., 1990), (f) (Takeoka y col., 1992), (g) (Flath y col., 1967), (h) (Buttery, 1993), (i) (Van Gemert y Nettenbreijer, 1977), (j) (Fazzalari, 1978), (k) (Burdock, 2002). Means within the same row followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD's test). nd: not detected. -: eluted with the solvent

Analysis of variance showed significant differences in volatile compound concentrations between the two seasons (Table 1). The production of ethyl acetate and *tert*-butyl propanoate was significantly higher in SS than in FS fruit. In contrast, FS fruit produced significantly more hexanoate esters (2-methylpropyl hexanoate, butyl hexanoate, pentyl hexanoate and hexyl hexanoate), butanoate esters (hexyl 2-methylbutanoate, hexyl butanoate, butyl 2-methylbutanoate) and some alcohols (2-ethyl-1-hexanol, 1-hexanol and 2-methyl-1-butanol).

Volatile compound emission after cold-storage for two successive seasons.

Based on overall concentrations of esters and alcohols emitted in FS and SS, the total amount of volatile compounds was 1.5-2 times greater in the second season than in the first (Figure 2). These differences could have been due to greater tree vigor and different climatic conditions during the maturity stage of the fruit, since the same cultural practices were applied and fruits were harvested at the same maturity stage.

Forty-three volatile compounds were emitted by the FS and SS fruit, including 34 esters and 9 alcohols (Table 1). As previously mentioned, fruit from SS released significantly higher concentrations of volatile compounds than that from FS. For this reason, and with the aim of identifying the atmospheres and storage times that most modify volatile compound emissions, we carried out a separate statistical analysis for each season. As we wanted to focus our study on the regeneration of volatile components, Tables 2-3 show the concentration of the volatile compounds that increased after the extra period under cold air after ULO storage, for both seasons. We were therefore able to confirm that the effect observed in the first season of the atmosphere, which resulted in an increase in the concentration of some volatile compounds, was also observed in the following season.

The volatile compounds whose presence was boosted by the additional period of cold air storage were: 6 acetate esters (propyl acetate, butyl acetate, pentyl acetate, hexyl acetate, 2-methylpropyl acetate and 2-methylbutyl acetate), 3 propanoate esters (butyl propanoate, butyl 2-methylpropanoate and 2-methylbutyl propanoate), 3 butanoate esters (ethyl butanoate, butyl butanoate and hexyl 2-methylbutanoate), 3 hexanoate esters (ethyl hexanoate, butyl hexanoate and pentyl hexanoate) and 3 alcohols (1-propanol, 1-butanol and 2-heptanol). It should be remarked that 10 out of these 15 volatile esters were straight chain esters according to Young et al. (2004) who revealed that the level of esters with low molecular weights increased more quickly after

withdrawal from CA conditions than that of esters with high molecular weights, suggesting possible biosynthetic implications.

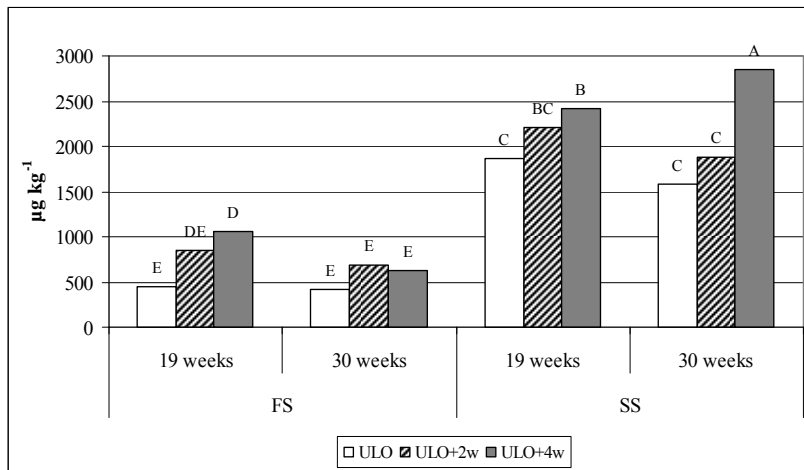


Figure 2. Total volatile compounds ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by 'Fuji Kiku[®] 8' apples for both seasons (FS, SS) after storage for 19 and 30 weeks plus 7 days at 20 °C. Means with different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

Quantitatively speaking, the most important volatile compound for FS fruit (Table 2) was 2-methylbutyl acetate. This was followed by hexyl 2-methylbutanoate and hexyl acetate, which add greater intensity to fruity and fresh-green apple aroma (López et al., 2007)). These three compounds also presented a positive log odor unit and could therefore be considered characteristic volatile compounds for the variety. From Table 2, it is observed that applying a 4-week period of cold air storage after 19 weeks of ULO storage resulted in an increase in these volatile compounds with respect to their concentrations in ULO stored fruits. The aroma profile of this variety seemed therefore enhanced. The increase in the concentration of these volatile compounds was not as clear for fruit stored for 30 weeks, except in the case of 2-methylbutyl acetate.

The next challenge is therefore to separate the most important flavor compounds, which may be trace chemicals, from the vast majority of inactive compounds. A review of 33 other volatile compounds studies in apples revealed that hexyl acetate was the only ester reported in every study (Young et al., 2004). Earlier studies showed that hexyl acetate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate and 2-methylbutyl acetate were the most characteristic compounds in this variety (Echeverría et al., 2004b). From our results, 6 volatile compounds were found to have an impact on overall flavor, based on log odor units. Ethyl butanoate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, 2-methylbutyl acetate, 2-

methylbutyl propanoate and hexyl 2-methylbutanoate were found to have positive log odor units (Table 2) and thus to contribute to the aroma profile of ‘Fuji’ apples after storage. If we specifically focus on each of these compounds, the amount of 2-methylbutyl acetate increased with both ULO+2w and ULO+4w storage conditions and there were no significant differences between either of the short and long-term storage periods. In contrast, for hexyl 2-methylbutanoate, the increase in concentration was only observed when fruit was stored under the ULO+4w storage conditions as opposed to ULO and for short-term storage. Finally, for hexyl acetate, the longer the extra period of cold air storage lasted, the higher was the concentration of the compound resulting from short-term storage. We should also point out that ethyl butanoate and ethyl hexanoate showed positive log odor units and should therefore also be supposed to contribute to Fuji flavor. From our results for these compounds, we conclude that the ULO+4w storage conditions were the most efficient for increasing their concentration, being associated with high intensity fruity, sweet and fresh aromas in this variety (Dimick and Hoskin, 1982; Rizzolo et al., 1989; Burdock, 2002).

Table 3 shows results for volatile compounds emitted by the SS fruit. As in FS, the main volatile compounds, in quantitative terms, were 2-methylbutyl acetate, hexyl 2-methylbutanoate and hexyl acetate. The ULO+4w storage conditions were the most efficient for increasing the total amount of these compounds for both storage periods respect to ULO stored fruit. In this SS, butyl acetate, hexyl acetate, butyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, 2-methylbutyl acetate, butyl 2-methylpropanoate, 2-methylbutyl propanoate and hexyl 2-methylbutanoate also presented positive log odor units, which could therefore be supposed to contribute to ‘Fuji’ flavor. Butyl acetate, 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate, and hexyl hexanoate have all been identified as being responsible for overall apple aroma in several different cultivars (Young et al., 1996; Plotto et al., 1999). For most of these compounds, ULO+4w storage conditions were the most efficient in increasing their concentration.

Table 2. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Fuji Kiku[®] 8’ apples after storage for 19 and 30 weeks plus 7 days at 20 °C in the first season (FS).

Esters and alcohols	Storage			
	weeks	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Propyl acetate	19	2.5 cd	7.1 b	9.1 a
	30	1.4 d	3.2 c	3.4 c
Butyl acetate	19	7.9 cd	23.9 b	39.1 a
	30	5.0 d	13.2 c	10.5 cd
Pentyl acetate	19	5.7 c	7.4 bc	13.8 a
	30	6.4 c	7.0 bc	9.7 b
Hexyl acetate	19	29.8* c	47.6* b	93.6* a
	30	24.8* c	43.2* b	33.5* c
Butyl propanoate	19	1.8 cd	7.3 b	14.9 a
	30	1.1 d	2.9 c	2.0 cd
Ethyl butanoate	19	1.6* b	5.8* a	6.9* a
	30	0.8* b	3.0* ab	3.6* a
Butyl butanoate	19	1.2 d	3.9 c	11.6 a
	30	1.9 d	8.2 b	3.3 cd
Ethyl hexanoate	19	nd	nd	5.4* a
	30	nd	nd	10.9* a
Butyl hexanoate	19	7.7 e	15.0 cd	41.1 a
	30	13.4 d	31.6 b	18.9 c
Pentyl hexanoate	19	2.2 c	2.1 c	5.5 ab
	30	5.0 b	6.4 a	3.9 b
2-Methylpropyl acetate	19	4.2 c	6.5 b	10.4 a
	30	4.5 bc	6.3 bc	5.7 bc
2-Methylbutyl acetate	19	290.1* b	469.2* a	456.8* a
	30	194.2* c	299.6* b	300.0* b
Butyl 2-methylpropanoate	19	1.8 c	4.4 b	9.1 a
	30	nd	nd	nd
2-Methylbutyl propanoate	19	6.0* b	12.9* a	12.6* a
	30	5.6* b	11.4* a	11.6* a
Hexyl 2-methylbutanoate	19	43.3* b	50.2* b	112.1* a
	30	43.5* b	52.2* b	53.4* b
1-Propanol	19	3.1 cd	5.9 b	7.8 a
	30	2.5 d	4.0 cd	4.2 c
1-Butanol	19	2.5 cd	14.0 b	27.0 a
	30	0.9 d	6.6 c	6.0 cd
2-Heptanol	19	1.4 b	nd	nd
	30	4.0 b	12.5 a	9.8 a

Means followed by different letters for a given volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). * Volatile compound with log odour units >0 . nd: not detected.

A recent study on ‘Fuji’ apples detected 10 compounds that were judged likely to make a significant contribution to ‘Fuji’ apple aroma, based on the detection frequency method. The highest detection frequency value was 8, indicating that all eight assessors detected the odorant compound at the same retention time. Some of them, including ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methylpropyl acetate, and 2-methylbutyl acetate, were defined by fruity notes (apple, pear, strawberry) whereas others, such as hexanal, (Z)-hexen-3-ol, and 1-octanol, were identified by green notes (grass, green, green apple). The high detection frequency of these compounds can be

explained not only by their low odor thresholds but also by their quantity (Mehinagic et al., 2006). Young et al. (2004) revealed that red-skinned apples (including ‘Fuji’, ‘Red Delicious’, ‘Royal Gala’, ‘Pink Lady’, ‘Jonagold’, ‘Idared’ and ‘Spartan’) had the highest total ester values, with the green-skinned cultivars having the lowest values (‘Golden Delicious’ and ‘Granny Smith’). Furthermore, various authors have suggested that the intensity of skin color may be correlated with total ester content, at least in the case of ‘Red Delicious’ apples (Miller et al., 1998; Fellman et al., 2000).

Table 3. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Fuji Kiku[®] 8’ apples after storage for 19 and 30 weeks plus 7 days at 20 °C in the second season (SS).

Esters and alcohols	Storage	ULO	ULO+2w	ULO+4w
	weeks			
Propyl acetate	19	29.8 ab	28.7 ab	33.8 a
	30	21.0 b	21.2 b	31.4 ab
Butyl acetate	19	93.8* b	91.5* b	140.4* ab
	30	88.6* b	86.0* b	179.5* a
Pentyl acetate	19	26.9 b	29.6 b	31.4 ab
	30	26.7 b	27.9 b	36.9 a
Hexyl acetate	19	133.1* b	196.6* a	200.7* a
	30	138.5* b	142.8* b	215.3* a
Butyl propanoate	19	16.7 c	21.1 bc	22.0 bc
	30	27.0* bc	34.7* b	79.3* a
Ethyl butanoate	19	6.2* c	9.6* ab	8.4* b
	30	6.8* c	8.2* b	10.7* a
Butyl butanoate	19	18.4 d	29.3 c	36.7 b
	30	49.5 a	28.9 c	50.1 a
Ethyl hexanoate	19	nd	Traces	10.0* a
	30	nd	5.0* c	6.7* b
Butyl hexanoate	19	52.6 c	77.0 bc	96.8 ab
	30	98.2 ab	89.1 b	114.3 a
Pentyl hexanoate	19	4.7 c	9.5 b	9.6 b
	30	13.0 a	14.4 a	13.7 a
2-Methylpropyl acetate	19	13.2 c	16.0 b	17.3 b
	30	15.8 bc	15.2 bc	21.8 a
2-Methylbutyl acetate	19	671.5* b	820.5* ab	885.1* ab
	30	660.2* b	653.6* b	1058.9* a
Butyl 2-methylpropanoate	19	11.1 c	14.1 bc	14.7 bc
	30	18.0 bc	23.1* b	52.9* a
2-Methylbutyl propanoate	19	30.9* b	26.8* b	37.9* a
	30	34.5* ab	36.5* ab	38.7* a
Hexyl 2-methylbutanoate	19	207.5* c	228.3* bc	315.9* b
	30	310.5* bc	285.1* bc	429.1* a
1-Propanol	19	25.0 c	38.6 ab	33.6 b
	30	27.0 c	32.7 b	42.8 a
1-Butanol	19	70.6 b	73.4 b	76.2 b
	30	54.8 c	67.9 b	98.8 a
2-Heptanol	19	21.0 b	25.0 b	49.1 a
	30	Traces	Traces	Traces

Means followed by different letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). * Volatile compound with log odour units >0 . nd: not detected. Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$

In summary, an atmosphere involving 4 week air storage following ULO storage proved an efficient way to enhance aroma volatile compounds in cold-stored 'Fuji Kiku[®] 8' apples over two seasons.

Relationship between consumer acceptability and volatile compound emissions.

It seems that determining the optimal maturity stage of different apple cultivars based on the usual parameters: color, total soluble solids, and titratable acidity, may not be sufficient to satisfy consumer demands with respect to optimal sensory quality. Moreover, the sensory quality of fruits changes during maturation, but the way in which this occurs differs from one cultivar to another (Mehinagic et al., 2006).

As previously revealed, the ULO+4w atmosphere produced the greatest quantity of volatile compounds after storage, in comparison with ULO stored fruit. The next step would be to ascertain its influence on sensory acceptability. All 43 volatile compounds (Table 1) and consumer acceptability were used to characterize fruit after storage, as it is well-known that although some volatile compounds are considered characteristic for particular varieties, others also contribute to them as background notes (Buttery, 1993). As it was stated before, both seasons present the same pattern for most individual compounds but the amount of total volatile compounds was higher for the second season. Therefore, it is convenient to analyze the data from each season independently. Two principal component analyses were carried out. Figure 3A presents results for samples collected in the first season (FS) (6 samples x 44 variables) and Figure 3B shows similar data for the second season (SS) (6 samples x 44 variables). PC1 and PC2 accounted for 74 % and 78 % of total variability in the FS and SS, respectively.

In Figure 3A, it is possible to observe clearly ULO stored fruit on the left side of the graph, containing the lowest amount of most of the volatile compounds. ULO+2w and ULO+4w subjected to long-term storage were located in the upper middle part of the figure, and a last group of samples, corresponding to short-term storage, on the right side of the graph. From these data, we can conclude that the ULO stored fruit was less accepted than the other samples, possibly due to its low emission of volatile compounds. In contrast, fruit subjected to conditions with cold air following ULO storage was the most accepted. This increased emission of all detected esters might be indicative of a sudden increase in the pool of substrates for the esterification reaction upon re-exposure to air (Rudell et al., 2002).

butanoate ($r = 0.96$), and hexyl 2-methylbutanoate ($r = 0.92$). These correlations might have arisen from the substrate preferences of the alcohol acyltransferase (AAT) catalyzing the esterification reaction (Altisent et al., 2009).

For the second season (Figure 3B), PCA proved a good model because 78 % of the variance observed in the samples was explained by the variables. As in the first season, the ULO+4w stored fruit was the most accepted by consumers, followed by fruit subjected to the ULO+2w atmosphere, with the ULO fruit being the least accepted. Similarly to in the first season, in the second season, an excellent correlation was observed between some alcohol precursors and their corresponding esters. Hence, the correlation between ethanol and ethyl acetate ($r = 0.89$); 1-propanol and propyl hexanoate ($r = 0.99$); 2-methyl-1-propanol and 2-methylpropyl butanoate ($r = 0.85$) and 2-methylpropyl propanoate ($r = 0.83$); 1-butanol and butyl acetate ($r = 0.88$) and butyl 2-methylbutanoate ($r = 0.94$). Other works on 'Fuji' apples have shown a significant correlation between aroma intensity scores and the overall quantity of odorant volatiles ($r = 0.62$), showing that the development of sensory aroma is similar to that of odorant volatiles (Mehinagic et al., 2006).

As a general overview, it can be concluded that a period of cold air storage, after fruit has been subjected to ULO storage, can potentially enhance the emission of some volatile compounds from short and long term stored 'Fuji Kiku 8' apples. This pattern for the emission of aroma volatiles was similar in both seasons. In addition, these fruits were more liked by consumers.

4. Acknowledgment

R. Altisent is the recipient of a government grant from Spain's *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA). This work was financially supported by the INIA through project RTA2005-00050-00-00.

5. References

Aaby, K.; Haffner, K.; Skrede, G. 2002. Aroma quality of Gravenstein apples influenced by regular and controlled atmosphere storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 254-259.

- Altisent, R.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, L.; Lara, I.** 2009. Lipoyxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen of 'Fuji' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4305-4312.
- Altisent, R.; Graell, J.; Lara, I.; López, L.; Echeverría, G.** 2008. Regeneration of volatile compounds in 'Fuji' apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8490-8497.
- Baudry, R. M.** 1999. Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 293-303.
- Brackmann, A.** 1990. Possibilities of aroma improvement in apples during CA storage. In *XXIII International Horticultural Congress*; ISHS: Firenze, Italy, Abstracts; Vol.2, p 3316.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavour Ingredients*, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL.
- Buttery, R. G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavour of tomato and other vegetables and fruits. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*; Acree, T. E., Teranishi, R.; Eds.; ACS Professional: Washington; p. 261.
- CAMO ASA.** 1997. *Unscrambler Users Guide, ver. 7.6. Programme Package for Multivariate Calibration*; Trondheim, Norway.
- Crisosto, C. H.; Crisosto, G. M.** 2002. Understanding American and Chinese consumer acceptance of 'Redglobe' table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 155-162.
- De Pooter, H. L.; Montens, J. P.; Willaert, G. A.; Dirinck, P. J.; Schamp, N. P.** 1983. Treatment of Golden Delicious apples with aldehydes and carboxylic acids: effect on the headspace composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 813-818.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C.** 1982. Review of apple flavour. State of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 387-409.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Temperature of hypoxic treatment alters volatile composition of juice from Fuji and Royal Gala apples. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 71-83.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004a. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of 'Fuji' apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004b. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.

- Echeverría, G.; Lara, I.; Fuentes, T.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004c. Assessment of relationships between sensory and instrumental quality of controlled-atmosphere-stored 'Fuji' apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.
- Fazzalari, F. A.** 1978. *Compilation of Odor and Taste Threshold Data*. ASTM Data series DS 48.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavour regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Goff, S. A.; Klee, H. J.** 2006. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value. *Science*, 311, 815-819.
- Graell, J.; Larrigaudiere, C.; López, M. L.** 1997. Effect of low-oxygen atmospheres on quality and superficial scald of 'Topred' apples. *Food Science and Technology International*, 3, 203-211.
- Harker, F. R.; Johnston, J. W.** 2008. Importance of texture in fruit and its interaction with flavour. In *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; CRC Press: Washington, DC; pp. 132-149.
- Iglesias, I.; Echeverría, G.** 2009. Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Scientia Horticulturae*. 120, 41-50.
- Lavilla, T.; Puy, J.; López, M. L.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Relationship between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in Granny Smith apples stored in different controlled-atmosphere treatments by means of multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3791-3803.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- López, M. L.; Villatoro, C.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; Echeverría, G.** 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady[®]' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 55-66.
- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley J. and Sons Eds.; Chichester, UK; pp. 116-165.
- Masseron, A.; Trillot, M.; Mathieu, V.; Tronel, C.** 1995. *Fuji*. CTIFL.

- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 194-199.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- 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.
- Miller, T. W.; Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.; Mattinson, D. S.** 1998. Factors that influence volatile ester biosynthesis in 'Delicious' apples. *Acta Horticulturae*, 464, 195-200.
- Paz, O.; Janes, H.; Prevost, B.; Frenkel, C.** 1982. Enhancement of fruit sensory quality by postharvest applications of acetaldehyde and ethanol. *Journal of Food Science*, 47, 270-276.
- Pesis, E.; Marinansky, R.; Avissar, I.** 1989. Effect of prestorage treatments with acetaldehyde vapors or anaerobic conditions on volatiles accumulation during storage of various fruits. *Acta Horticulturae*, 258, 661-667.
- Plotto, A.; McDaniel, R. M.; Mattheis, J. P.** 1999. Characterisation of Gala apple aroma and flavour: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Poole, C. L.; Poole, S. K.** 1993. The Column in Gas Chromatography. In *Chromatography Today*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp 176-181.
- Rizzolo, A.; Polesello, A.; Teleky-Vamosy, G. Y.** 1989. CGC/Sensory analysis of volatile compounds developed from ripening apple fruit. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12, 824-827.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W.** 1998. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Hrsg: Garching, Germany.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wyllie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.

- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics.* 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schnabel, K. O.; Belitz, H. D.; Von Ranson, C.** 1988. Investigations on the structure-activity relationships of odorous substances. Part 1. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen function. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 187, 215-223.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 471-477.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ling, L.** 1996. Odour thresholds of various branched and straight chain acetates. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 677-680.
- Tieman, D. M.; Zeigler, M.; Schmelz, E. A.; Taylor, M. G.; Bliss, P.; Kirst, M.; Klee, H. J.** 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 57, 887-896.
- Van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. H.** 1977. *Compilation of Odour Threshold Values in Air and Water.* National Institute for Water Supply: Voorburg, The Netherlands.
- Wang, Y.; Finn, Ch.; Qian, M. C.** 2005. Impact of growing environment on Chickasaw Blackberry (*Rubus L.*) aroma evaluated by gas chromatography olfactometry dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3563-3571.
- Whitaker, B. D.** 2008. Postharvest flavour deployment and degradation in fruits and vegetables. In: *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; CRC Press: Washington, DC; pp 103-131.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Young, J. C.; Chu, C. L. G.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.

CAPÍTULO 3

Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of 'Fuji' apple.

Rosa Altisent, Gemma Echeverría, Jordi Graell, Luisa López y Isabel Lara
Publicado en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009), 4305-4312.

Abstract

An extra period under cold air after ultra-low oxygen storage has been shown to increase the concentration of some volatile compounds emitted by stored 'Fuji' apples. The purpose of this work was to assess the role, if any, of lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in the regeneration of fruit capacity for volatile production after ultra-low oxygen storage. Fruit were stored at 1 °C and 92 % relative humidity under ultra low oxygen (1% O₂: 1% CO₂); one lot was kept under hypoxia for 19 or 30 weeks, a second lot was maintained for 17 or 28 weeks under these conditions and then stored for 2 weeks in cold air, and the third lot remained for either 15 or 26 weeks under ultra-low oxygen followed by 4 weeks under cold air. Samples were placed subsequently at 20 °C, and analyses of volatile emission and enzyme activities were undertaken 1 and 7 days thereafter. Fruit stored during four weeks in cold air after ultra-low oxygen storage showed the highest capacity for volatile regeneration. Higher emission of volatiles by these samples was concomitant with higher levels of lipoxygenase activity. Results suggest that lipoxygenase activity, particularly in the flesh tissue, was strongly related to the regeneration of the emission of volatile compounds allowed by the extra period in cold air after ultra-low oxygen storage, and thus appears to be a key control point for successful recovery of fruit ability for volatile compound production.

Keywords: apple, aroma regeneration, cold air storage, hydroperoxide lyase, lipoxygenase, ultra-low oxygen storage, volatile emission

1. Introduction

‘Fuji’ apples (*Malus × domestica* Borkh.) display interesting quality attributes (crispy texture, sweet and aromatic flavour) and good potential for post-harvest storage. Owing to these favourable quality and marketing characteristics, this cultivar is widely cultivated in the main producing areas of the world. Controlled atmosphere (CA) is recommended for the storage of a wide range of apple cultivars due to substantial lengthening of storage period and for retaining fruit quality, especially in terms of preservation of flesh firmness and epidermis color, and of lowered oxidation of organic acids. During the last decades, the application of new CA techniques involving very low oxygen levels (around 0.8-1.2%) in the storage atmosphere has been increasingly adopted by the fruit industry. However, the negative impact of CA storage on the biosynthesis of some volatile compounds, both under standard and ultra-low oxygen (ULO) conditions, is also well documented for a number of apple cultivars (Harb et al., 2000; Fellman et al., 2003; Echeverría et al., 2004a, 2004b; Mattheis et al., 2005; Lara et al., 2007). These changes in volatiles during and after storage are important from the commercial point of view, as they play a key role in the consumer perception of fruit flavor (Echeverría et al., 2004c; Harb et al., 2008). Moreover, prolonged storage of apples in very low O₂ and/or high CO₂ atmospheres may cause detrimental effects on fruit quality as a consequence of the onset of fermentative processes, leading to ethanol and acetaldehyde accumulation, development of off-flavor, failure to ripen after removal to air, and development of low O₂ and/or high CO₂ injury (Ke et al., 1991).

Several techniques have been tested to improve the regeneration of aroma volatile compounds after CA storage of apples, including exposure to exogenous ethylene during or after storage (Brackmann, 1990; Mattheis et al., 2005), treatment with precursors of ester compounds (De Pooter et al., 1983; Pesis et al., 1989; Brackmann, 1990) or exposure to hypoxia with atmospheres up to 100 % CO₂ (Dixon and Hewett, 2000, 2001). Similarly, some regeneration of volatile production is achieved when fruit are placed in air after storage in atmospheres with low O₂ and/or high CO₂ (Brackmann, 1990; Plotto et al., 2000; Fellman et al., 2003; Young et al., 2004; Altisent et al., 2008). Among these strategies, the extra period under refrigerated air after ULO storage has the additional advantage of its easy application in commercial cold stores.

Volatile esters account for up to 80%, 88%, 90% and 98% of total volatiles in ‘Golden Delicious’ (López et al., 1998a), ‘Granny Smith’ (Lavilla et al., 1999), ‘Fuji’

(Echeverría et al., 2004c), and ‘Starking Delicious’ (López et al., 1998b), respectively. Volatile esters are known to be the most significant contributors to apple aroma (Rowan et al., 1999; Fellman et al., 2003), together with some alcohols (2-methylpropanol, (Z)-hexen-3-ol, 1-hexanol and 1-octanol) and aldehydes (1-hexanal) that are considered as principal odorant compounds in aroma extracts of ‘Golden Delicious’, ‘Fuji’, and ‘Braeburn’ (Mehinagic et al., 2006). Esters produced by a ripening apple fruit can be broadly separated into straight-chain and branched-chain types, the formation of which is partly dependent on the availability of the corresponding acid and alcohol precursors (Dixon and Hewett, 2000). In general, fatty acids are considered to be major precursors of straight-chain volatile esters in apples, the biosynthetic pathways including β -oxidation, hydroperoxyacid cleavage, and lipoxygenase (LOX) action to form the respective aldehydes, ketones, acids, alcohols, and esters (Yahia, 1994; Sanz et al., 1997; Rowan et al., 1999; Defilippi et al., 2005). Branched-chain esters are thought to arise from the metabolism of branched-chain amino acids (Sanz et al., 1997; Wyllie and Fellman, 2000). The capacity to regenerate the biosynthesis of volatile compounds, especially that of esters, which is of great importance to preserve the eating quality of fruit, is reduced after long-term storage (Li et al., 2006), which influences negatively the consumer acceptability of produce.

Decreased production of volatiles after CA storage of apple fruit is to some extent the consequence of limited lipid-derived substrate availability arising from partial arrest of some related enzyme activities (Dixon and Hewett, 2001; Lara et al., 2006, 2007). LOX activity, which catalyzes the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids, has been found to be essential for the recovery of the ability to synthesize volatile esters after CA storage of apple (Lara et al., 2006, 2007) and pear (*Pyrus communis* L.) (Lara et al., 2003). Cleavage of fatty acid hydroperoxides produced by LOX into aldehydes and oxo-acids by hydroperoxide lyase (HPL) is likely to be another control point in the biosynthesis of volatile esters through the LOX system (Song and Bangerth, 2003; Villatoro et al., 2008). The availability of lipid-derived substrates obtained through this pathway thus appears a major factor affecting volatile ester production after storage.

The present study investigated the influence of different periods in cold air subsequent to ULO storage on volatile production by ‘Fuji’ apples. We also aimed at evaluating a possible relationship to modifications in LOX and HPL activities in fruit

tissues, and at finding out whether it might be possible to predict the potential for the regeneration of the main volatile compounds from these two enzyme activities.

2. Materials and methods.

Plant material and storage conditions

Apple (*Malus × domestica* Borkh. cv. 'Fuji Kiku[®] 8') fruits were harvested in 2006 at commercial maturity, 182 days after full bloom (dafb), from 5 year-old trees grown on M-9 EMLA rootstock at an experimental orchard (Estació Experimental IRTA-Mollerussa) in the area of Lleida (NE Spain). Flesh firmness at harvest averaged 69.3 N, soluble solids content was 16.3 g 100 g FW⁻¹, and titratable acidity was 2.9 g malic acid L⁻¹. Immediately after harvest, 3 lots of 100 kg of apples were selected for size, color uniformity and absence of defects, and stored at 1 °C and 92 % relative humidity (RH) in ultra-low oxygen atmosphere (ULO; 1% O₂ : 1% CO₂) for up to either 19 or 30 weeks. One lot of ULO-stored fruit remained under these conditions for the whole 19 or 30 weeks. A second lot was kept for either 17 or 28 weeks under ULO conditions and then stored for 2 weeks in cold AIR (ULO+2w). A third batch of fruit was kept for either 15 or 26 weeks in ULO followed by a further 4 weeks in cold AIR (ULO+4w). After storage, fruit were stored at 20 °C in order to simulate commercial shelf-life during 1 or 7 days. Volatile compound emission, enzyme activities and content of acetaldehyde in fruit juice were measured at harvest and after removal from storage plus 1 and 7 days at 20 °C.

Chemicals

All of the standards for the volatile compounds studied in this work were of analytical grade, and were purchased at the highest quality available. Ethyl acetate, *t*-butyl propanoate, propyl acetate, 1-propanol, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, pentyl acetate, 2-methyl-1-butanol, hexyl acetate, 1-hexanol, hexyl 2-methylbutanoate and 2-ethyl-1-hexanol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was purchased from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain). 2-methylpropyl acetate was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain). The rest of the compounds (up to 49) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Analysis of volatile compounds

Eight kg of apples (2 kg/replicate \times 4 replicates) per treatment (atmosphere \times storage period \times shelf-life period) were selected for analysis of volatile compounds both at harvest and after removal from storage. Intact fruits were placed in an 8 L Pyrex container through which an air stream (900 mL min⁻¹) was passed for 4 h. The resulting effluent was then passed through an ORBO-32 adsorption tube filled with 100 mg of activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL of diethyl ether. The identification and quantification of volatile compounds was performed on a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector (GC-FID), using a polyethyleneglycol capillary column with cross-linked free fatty acid as the stationary phase (FFAP; 50 m \times 0.2 mm \times 0.33 μ m) into which a volume of 1 μ L of the extract was injected in all the analyses. The oven program was set at 70 °C (1 min) and the temperature was first raised by 3 °C min⁻¹ to 142 °C, later by 5 °C min⁻¹ to 225 °C, and then kept constant for 10 min at this later temperature. Helium was used as the carrier gas (42 cm s⁻¹), with a split ratio of 40:1. The injector and detector were held at 220 °C and 240 °C, respectively. A second capillary column (SGE, Milton Keynes, UK) with 5 % phenyl polysilphenylene-siloxane as the stationary phase (BPX5, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m) was also used for compound identification under the same operating conditions as described above. Compounds were identified by comparing their respective retention indexes with those of standards and by enriching apple extract with authentic samples. Quantification was carried out by adding 25 μ L of a 0.2% solution of butylbenzene (assay >99.5%, Fluka) as an internal standard. A GC-MS system was used for compound confirmation, using the same capillary column as in the GC analyses. Analysis was carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a 5973N mass selective detector. Mass spectrometric data were collected in full-scan. Scan ranged from 30-500 amu. The scan rate was 3.1 scans sec⁻¹. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (42 cm s⁻¹), following the same temperature gradient program as described previously. Spectrometric data were recorded (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) and compared with those from the NIST HP59943C original library mass spectra. Results were expressed as μ g kg⁻¹.

Analysis of acetaldehyde concentration

At each sampling date, juice from 20 fruits per treatment (atmosphere × storage period × shelf-life period) was individually obtained, a 5 mL sample was introduced in a 10 mL test tube, which was closed with an elastic cap and frozen at -20 °C until analysis of the acetaldehyde content as described in Ke et al. (1994). Frozen juice from each fruit was thawed and incubated at 65 °C for 1 h. A 1 mL headspace gas sample was taken with a syringe and injected into a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph, equipped with a column containing Carbowax (5%) on Carbopack (60:80, 2 m × 2 m i.d.) as the stationary phase, and a flame ionization detector. Nitrogen was used as the carrier gas (24 cm s⁻¹), and operating conditions were as follows: oven temperature 80 °C, injector temperature 180 °C, and detector temperature 220 °C. Acetaldehyde was identified and quantified by comparison with an external standard, and results were expressed as μL L⁻¹.

Extraction and assay of volatile-related enzyme activities

Lipoxygenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPL) activities were determined 1 and 7 days after removal from storage. Samples of both skin and flesh tissue were taken separately from four apples, frozen in liquid nitrogen, lyophilized, powdered, and kept at -80 °C until processing. 100 mg of lyophilized powdered tissue was used for each individual assay. LOX activity was determined as described elsewhere (Lara et al., 2003). Briefly, the sample was homogenized in 1 mL of extraction solution (0.1 M phosphate, pH 7.5, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVPP)). After centrifugation, 100 μL of the supernatant were diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), and LOX activity was measured as the increase in absorbance at 234 nm over time, due to formation of hydroperoxides from linoleic acid as the substrate. For the analysis of HPL activity, tissue was homogenized in 1 mL of extraction solution (85 mM MES, pH 6.0, 5 mM DTT, 0.1 % (v/v) Triton X-100 and 1 % (w/v) PVPP). After centrifugation, 100 μL of the supernatant were used for the determination of HPL activity according to the coupled assay described by Vick (1991). The reduction of NADH, in the presence of a commercial ADH and the aldehyde substrates generated by the HPL-catalyzed reaction, was measured by following the increase in absorbance at 340 nm over time. Total protein content in the enzyme extract was determined with the Bradford method (Bradford, 1976), using BSA as a standard. In both cases, one activity unit (U) was defined as the variation in one

unit of absorbance per minute, as measured in an Ati Unicam UV 2 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Spain). Each determination was done in triplicate, and results were expressed as specific activity (U mg protein⁻¹).

Statistical Analyses

A multi-factorial design was used to statistically analyze the results. The factors considered were storage period, storage atmosphere and shelf-life period. All data were tested by analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) using the SAS program package (SAS, 1988). Means were separated by the LSD test at $p \leq 0.05$. For multivariate analysis, samples were characterized according to the averages for the parameters assessed (volatile compounds, acetaldehyde content and enzyme activities). To provide a general overview of the samples after cold storage, a principal component analysis (PCA) was developed. Two PCA models were performed for each of the two post-storage periods at 20 °C (1 and 7 days) considered. 54 variables (volatile compounds emissions, acetaldehyde content and LOX and HPL activity both in skin and flesh tissues) were considered in each case for sample characterization. Partial least square regression (PLSR) was also used as a predictive method to relate ester emission (Y) to LOX and HPL activities (X) as potentially explanatory variables. Unscrambler vers. 7.6a software (CAMO ASA, 1997) was used to develop these models. As a pre-treatment, data were centered and weighted using the inverse of the standard deviation of each variable in order to avoid the influence of the different scales used for the variables (Martens and Naes, 1989). Full cross-validation was run as a validation procedure.

3. Results and discussion.

Biosynthesis of volatile compounds after ultra-low oxygen storage.

49 volatile compounds (37 esters, 10 alcohols, 1 terpene and 1 ketone) were identified in the volatile fraction emitted by ‘Fuji’ apples at harvest and after cold storage (Table 1). Quantitatively, the most important volatile compounds after storage were 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate, accounting together for up to 67% of the total volatile compound emission. No clear trend for the different compounds was found 1 day after removal from cold storage when comparing the different treatments. After 7 days, contrarily, considered as the mean time for fruit to

arrive to consumers, an increase in some volatile compounds was observed for fruit kept under ULO+4w treatment and, to a lesser extent, under ULO+2w, as compared to ULO-stored samples. All detected volatile compounds were included in the subsequent analyses since, while only some compounds are considered to have an impact on ‘Fuji’ flavor, the rest contribute as background notes.

Table 1. Compounds identified in the volatile fraction emitted by ‘Fuji Kiku[®] 8’ apples.

Straight-chain esters	RI₁^a	RI₂^b	Code	Branched-chain esters	RI₁^a	RI₂^b	Code
Methyl acetate	854	-	mA	<i>t</i> -Butyl propanoate	928	717	tbPr
Ethyl acetate	882	609	eA	2-Methylpropyl acetate	976	691	2mprA
Propyl acetate	994	649	prA	Ethyl 2-methylbutanoate	1015	845	e2mB
Methyl butanoate	955	656	mB	2-Methylpropyl propanoate	1046	865	2mprPr
Ethyl butanoate	1002	803	eB	2-Methylbutyl acetate	1096	876	2mbA
Propyl propanoate	1008	809	prPr	Butyl 2-methylpropanoate	1129	1009	b2mPr
Butyl acetate	1040	813	bA	2-Methylpropyl butanoate	1140	954	2mprB
Butyl propanoate	1123	910	bPr	2-Methylbutyl propanoate	1180	950	2mbPr
Pentyl acetate	1161	914	pA	2-Methylbutyl 2-methylpropanoate	1183	1016	2mb2mPr
Butyl butanoate	1218	1000	bB	Butyl 2-methylbutanoate	1235	1042	b2mB
Ethyl hexanoate	1239	1002	eHx	2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1300	1106	2mb2mB
Pentyl propanoate	1247	969	pPr	2-Methylpropyl hexanoate	1399	1153	2mprHx
Hexyl acetate	1292	1015	hxA	Hexyl 2-methylbutanoate	1488	1239	hx2mB
Propyl hexanoate	1353	1099	prHx	Heptyl 2-methylbutanoate	1505	1249	hp2mB
Hexyl propanoate	1379	1109	hxPr	Alcohols	RI₁^a	RI₂^b	Code
Butyl hexanoate	1473	1196	bHx	Ethanol	912	-	etOH
Hexyl butanoate	1477	1197	hxB	1-Propanol	992	-	1prOH
Ethyl octanoate	1499	1201	eO	2-Methyl-1-propanol	1054	996	2mprOH
Octyl acetate	1549	1215	oA	2-Pentanol	1087	-	2pOH
Pentyl hexanoate	1590	1293	pHx	1-Butanol	1119	626	1bOH
Hexyl hexanoate	1687	1392	hxHx	2-Methyl-1-butanol	1199	667	2mbOH
Butyl octanoate	1690	1394	bO	1-Pentanol	1262	688	pOH
Hexyl octanoate	1840	1707	hxO	2-Heptanol	1350	1198	2hpOH
Terpene and ketone	RI₁^a	RI₂^b	Code	1-Hexanol	1392	869	1hxOH
6-Methyl-5-hepten-2one	1395	795	mhone	2-Ethyl-1-hexanol	1565	1031	2ehxOH
α -Farnasene	1785	1647	farna				

^a Kovats retention index (Poole and Poole, 1993) in cross-linked FFAP column. ^b Kovats retention index (Poole and Poole, 1993) in BPX5 column. -, eluted with the solvent.

All 49 volatile compounds, acetaldehyde content in fruit juice, as well as LOX and HPL activities both in skin and flesh tissues, were used to characterize fruit at harvest and after storage (13 samples \times 54 variables). A preliminary PCA model (data not shown) revealed that stored fruit separated clearly from freshly-harvested samples, indicating modifications in the fruit capacity to synthesize volatile compounds after storage. In order to help interpretation of results, two further PCA models were developed for fruit kept 1 and 7 days at 20 °C subsequent to cold storage (Figure 1),

from which samples at harvest were excluded. The amount of total variability explained by principal components 1 (PC1) and 2 (PC2) in these models was 72% and 75%, respectively.

After 1 day at 20 °C (Figure 1A), the storage period was the main factor for sample differentiation along PC1, while discrimination along the PC2 axis was given mainly by storage atmospheres. Fruit kept 30 weeks under ULO+4w were associated to higher HPL activity in the flesh tissue, which was highly correlated to some volatile compounds such as 2-methylbutyl acetate ($r = 0.93$), 2-methylpropyl acetate ($r = 0.92$), hexyl 2-methylbutanoate ($r = 0.86$), pentyl hexanoate ($r = 0.84$), 2-methylbutyl 2-methylbutanoate ($r = 0.83$), butyl 2-methylbutanoate ($r = 0.82$) and butyl hexanoate ($r = 0.81$). Some of these compounds have been described as conferring “fruity” notes in apple aroma (Mehinagic et al., 2006; Plotto, 1989; Burdock, 2002). Particularly, 2-methylbutyl acetate is one of the volatile compounds mostly contributing to ‘Fuji’ flavor (Echeverría et al., 2004a). Pentyl hexanoate, adversely affected by anoxic conditions as reported elsewhere (Rudell et al., 2002), displayed a larger increase upon removal to air (Figure 1A).

In contrast, HPL activity in the skin fruit was associated to samples stored for 19 weeks in ULO and ULO+2w, and related mainly to ethyl acetate ($r = 0.88$) and ethanol ($r = 0.84$). Previous works (Mattheis et al., 1991) reported an increase in ethyl ester production, especially ethyl acetate, in whole apple fruit after hypoxic storage. It should also be noticed that ethyl 2-methylbutanoate, one of the most important compounds characterizing the aroma of the variety due to its low odor threshold ($0.006 \mu\text{g L}^{-1}$ according to Takeoka et al., (1992)), correlated well with ethanol ($r = 0.90$) and ethyl acetate ($r = 0.86$). Previous reports have shown a steadily decline for this compound during fruit maturation (Echeverría et al., 2004d; Lara et al., 2008); this would be in accordance with results reported herein, showing lower emission of ethyl 2-methylbutanoate for fruit at a more advanced maturity stage after storage (ULO+4w stored for 30 weeks). CA conditions, while leading to increased biosynthesis of ethanol, may actually limit the formation of ethyl esters as long as these storage conditions are maintained. More importantly, the procedure by which the fruit are exposed to air following CA storage may have a large effect on the final flavor profile of fruit after CA storage (Rudell et al., 2002).

Acetaldehyde content was correlated positively to α -farnasene ($r = 0.91$) and 2-heptanol ($r = 0.81$), but correlated inversely to most of the volatile compounds associated to ULO+4w samples. Thus, the extra period of four weeks under air caused a decline in acetaldehyde content. Acetaldehyde has been shown to be used by plant tissues to produce acetates (Kreuzwieser et al., 1999), and indeed an apparent relationship has been reported between acetaldehyde concentration and the emission of acetate esters by apples after CA storage (Lara et al., 2006, 2007; Villatoro et al., 2008). Accordingly, and in spite of the overall enhanced emission of volatile esters by ULO+4w fruit after storage for 30 weeks, most of the detected acetate esters were not associated to these samples (Figure 1A).

After 7 days at 20 °C (Figure 1B), samples stored in ULO+4w got the highest production of most of the identified volatile compounds regardless of storage duration. Some of these compounds were those being reportedly the major contributors to 'Fuji' flavor: ethyl hexanoate, ethyl butanoate, butyl acetate, butyl propanoate, hexyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylpropyl acetate, 2-methylbutyl acetate and 1-hexanol (Echeverría et al., 2004a; 2004c; Mehinagic et al., 2006), suggesting that the ULO+4w treatment helped overcome in part the characteristic ULO-induced loss in aroma quality (Harb et al., 2000; Echeverría et al., 2004a, 2004b). LOX activity in the flesh was well correlated to the flavor-contributing volatile esters in 'Fuji' apples, namely 2-methylbutyl acetate ($r = 0.95$), hexyl acetate ($r = 0.94$), pentyl acetate ($r = 0.92$), butyl acetate ($r = 0.91$), butyl 2-methylbutanoate ($r = 0.91$), 2-methylpropyl acetate ($r = 0.86$), 1-hexanol ($r = 0.86$) and 1-butanol ($r = 0.81$), suggesting this enzyme activity may be related to the biosynthesis of these volatile compounds. During fruit ripening, cell membranes become more permeable to different substrates (Bartley, 1985), increasing the chance of reaction between enzymes and substrates in the LOX pathway. In addition, storage under hypoxic conditions will lead to the partial arrest of oxygen-dependent processes and reactions, including LOX-catalyzed hydroperoxidation of fatty acids, and thus to the partial inhibition of the capacity for volatile emission (Lara et al., 2007; Lara et al., 2003, 2006). Accordingly, samples kept in air after ULO storage (ULO+2w and ULO+4w) were characterized by higher LOX activity in the flesh tissue, suggesting that the LOX pathway may be important for the regeneration of volatile biosynthesis after storage of 'Fuji' apples, although previous work suggested that LOX activity may be higher in the skin tissue (Rudell et al., 2002).

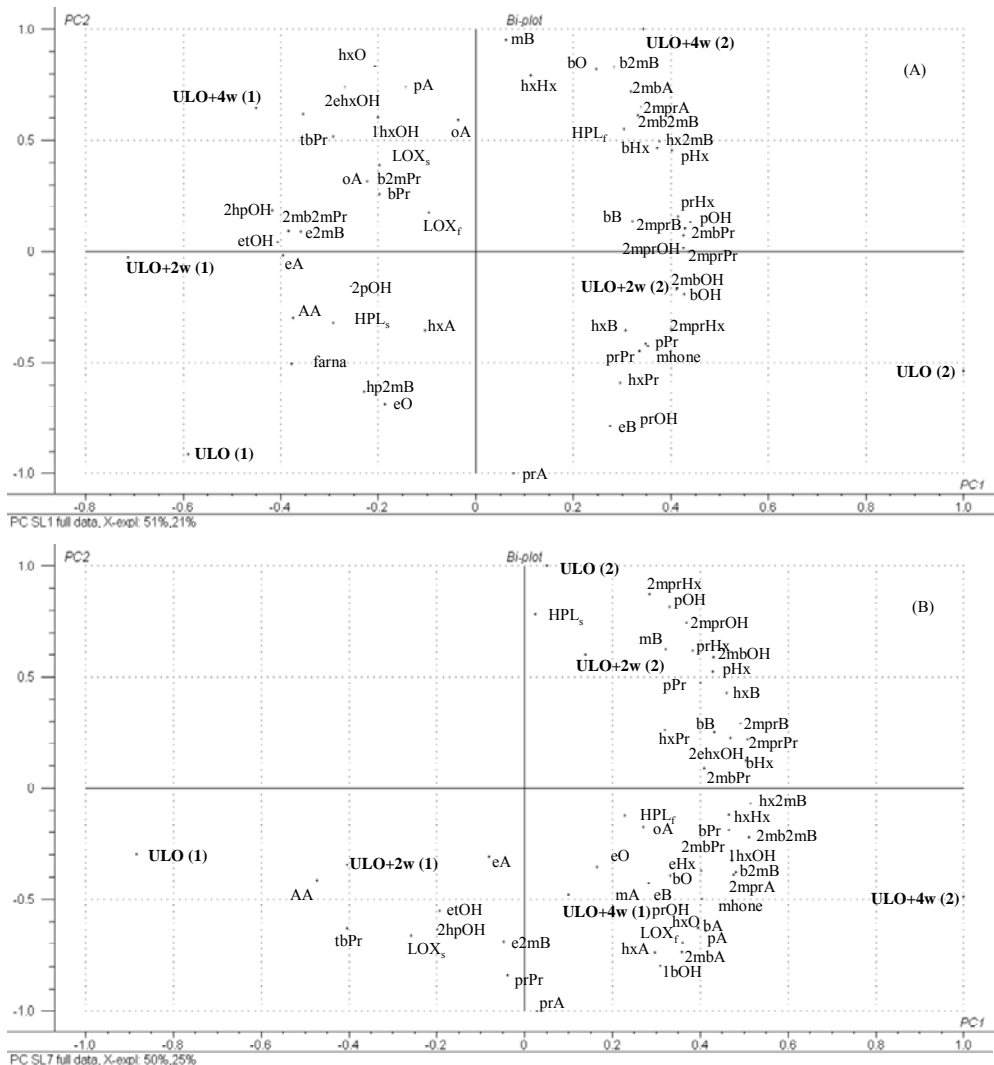


Figure 1. Biplot (scores and loadings) corresponding to a PCA model for 'Fuji Kiku[®] 8' apples after storage plus 1 (A) and 7 (B) days at 20°C. Volatiles are coded as indicated in Table 1 (AA, acetaldehyde). Suffix 's' or 'f' in enzyme labels refer to skin and flesh tissue, respectively. Sample labels are defined in the 'Materials and Methods' section. Numbers between brackets refer to cold storage period (1: 19 weeks; 2: 30 weeks).

Hydroperoxide lyase (HPL) is also an important enzyme for the biosynthesis of volatile esters through the LOX pathway, as it processes fatty acid hydroperoxides produced by LOX and contributes to the supply of the necessary aldehyde substrates for subsequent alcohol dehydrogenase (ADH)-catalyzed production of the corresponding alcohols (30). In accordance with this view, HPL activity in the flesh tissue was also associated to higher emission of most of detected compounds after 7 days at 20 °C

(Figure 1B). The emission of all detected esters increased dramatically after removal of fruit from hypoxia. This observation might be indicative of a sudden increase in the pool of substrates for the esterification reaction upon re-exposure to air (Rudell et al., 2002).

Higher LOX activity was associated to higher emission of 1-hexanol. No apparent relationship was observed between the availability of 1-hexanol and the production of hexanoate esters, whereas strong correlations were found between the levels of 1-hexanol and those of some hexyl esters such as hexyl 2-methylbutanoate ($r = 0.93$), hexyl hexanoate ($r = 0.81$) and, to a lesser extent, hexyl acetate ($r = 0.67$). These correlations might have arisen from the substrate preferences of the alcohol acyltransferase (AAT) catalyzing the esterification reaction. It has been reported that a recently isolated apple AAT gene (MpAAT1) produces preferentially hexyl esters from mid-length acyl-CoAs at both low and high concentrations of alcohol substrate (Souleyre et al., 2005).

PLSR model for the prediction of ester emission based on enzyme activities

Because 7 days is a usual period for stored fruit to reach the consumers, we chose to focus on samples kept 7 days at 20 °C after cold storage. For a more in-depth study of the influence of LOX and HPL activities on the regeneration of the emission of volatile compounds after ULO storage, the partial least-square regression (PLSR) method was used. This model considered HPL and LOX activity in both skin and flesh tissues as the potentially explanatory X variables and volatile ester emissions as the Y variables (Figure 2). The model developed indicated that the enzyme activities considered explained 62% of the total variability in ester production. The biplot (scores and loadings) for this model (Figure 2A) showed that fruit kept under ULO+4w separated clearly from the rest of samples along PC1. Samples stored under ULO+4w were characterized by higher LOX and HPL activities in the flesh tissue regardless of storage period. These samples were also associated to increased concentrations of most volatile esters detected during the analyses, with LOX activity as the variable having most weight on sample differentiation along PC1 (Figure 2B). In contrast, samples stored under ULO and ULO+2w were characterized by higher LOX and HPL activity levels in the skin for short- and long-term storage, respectively. Since these fruit produced lower levels of volatile compounds, it is suggested that LOX and HPL activities in the skin

had no influence on the development of aroma-synthesizing capacity during the post-storage period of ‘Fuji’ apples.

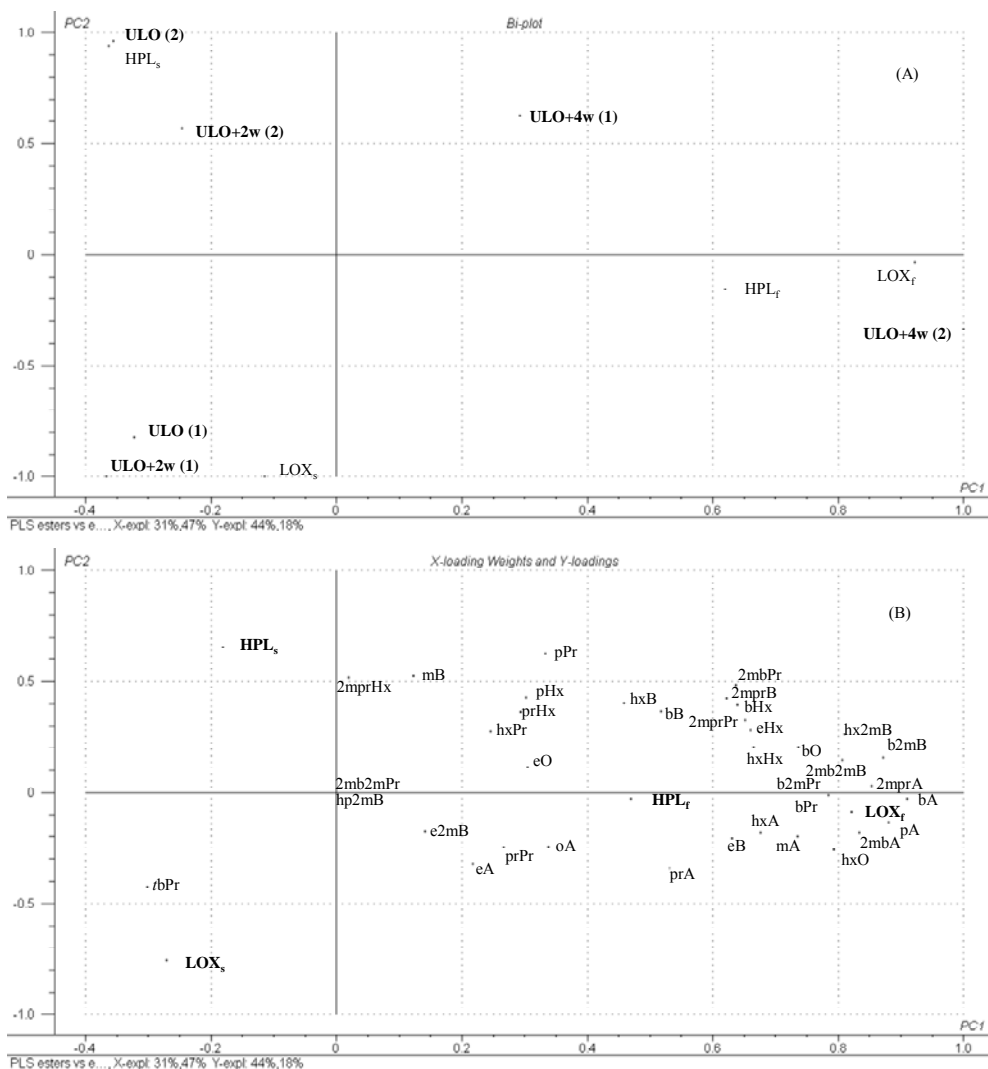


Figure 2. Biplot (A) and loading weights plot (B) of PC1 vs PC2 for a PLSR model of LOX and HPL activities (*X* variables) vs. ester emission (*Y* variable) for ‘Fuji Kiku’[®] 8’ apples after cold storage plus 7 days at 20°C. Volatiles esters are coded as indicated in Table 1 (AA, acetaldehyde). Suffix ‘s’ or ‘f’ in enzyme labels refer to skin and flesh tissue, respectively. Samples labels are defined in the ‘Materials and Methods’ section. Numbers between brackets refer to cold storage period (1: 19 weeks; 2: 30 weeks).

In order to assess whether it was possible to predict the emission of volatile esters from the activity levels for each of the enzyme activities considered, we chose to focus on the main volatile compounds mostly contributing to ‘Fuji’ flavor, namely ethyl

butanoate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, 2-methylbutyl acetate and ethyl 2-methylbutanoate (Echeverría et al., 2004a). A separate PLSR regression model was run for each impact compound, with enzyme activities (X variables) versus the production of each volatile ester. Two PLS factors were used for each PLSR model. The validation parameters for all five PLSR models are presented in Table 2. Prediction was excellent for all the volatiles included in these models, and particularly for hexyl acetate and 2-methylbutyl acetate, for which 96 and 98% of total variation, respectively, was explained by LOX and HPL activities. Regression coefficients (Table 3) showed strong relationships to LOX activity in the flesh of all compounds characterizing ‘Fuji’ flavor.

Table 2. Validation parameters for PLSR models of the major impact volatile compounds contributing to ‘Fuji Kiku® 8’ flavor (Y variables) vs. LOX and HPL activities (X variables).

Y variable	Correlation coefficient ^a	Explained variance ^b
Ethyl butanoate	0.84	70%
Ethyl hexanoate	0.88	79%
Hexyl acetate	0.98	96%
2-Methylbutyl acetate	0.99	98%
Ethyl 2-methylbutanoate	0.96	93%

^a Correlation between predicted and measured values.

^b Amount of Y variance explained by the first two PLS factors.

Table 3. Regression coefficients between LOX and HPL activities (X variables) and impact volatile compounds (Y variables) at $p < 0.05$.

Aroma compounds	Y variables			
	LOX flesh	LOX skin	HPL flesh	HPL skin
Ethyl butanoate	0.727	-0.023	-0.041	-0.284
Ethyl hexanoate	0.777	-0.355	0.067	0.067
Hexyl acetate	0.912	0.005	-0.185	-0.232
2-Methylbutyl acetate	0.848	-0.055	0.149	-0.250
Ethyl 2-methylbutanoate	0.669	0.236	-0.752	-0.105

These results highlight the importance of this biosynthetic pathway for the regeneration of the production of aroma volatile compounds after ULO storage. Indeed, LOX activity increased in the flesh tissue after storage under ULO+4w as compared to ULO and ULO+2w treatments (Figure 3) for both storage periods. Enhanced activity levels were also found in ULO+2w samples in comparison to ULO-stored fruit after 19, but not after 30 weeks of storage, suggesting that an additional period of 2 weeks in cold air was not effective for the recovery of LOX activity, and thus for aroma regeneration, after long-term storage of ‘Fuji’ apples. Similarly, only ULO+4w samples showed enhanced levels of HPL activity after long-term storage (Figure 3) in

comparison to ULO-stored fruit, suggesting that subsequent cleavage of fatty acid hydroperoxides might also be a key control point for volatile ester production after extended periods. The concluding remark that the LOX pathway is central for the regeneration of flavor after ULO storage of ‘Fuji’ fruit is also supported by the observation that four out of the five hexyl esters detected, among which some major contributors to ‘Fuji’ flavor, as well as 1-hexanol, their alcohol precursor, were closely associated to LOX and HPL activities in the flesh tissue (Figure 1B).

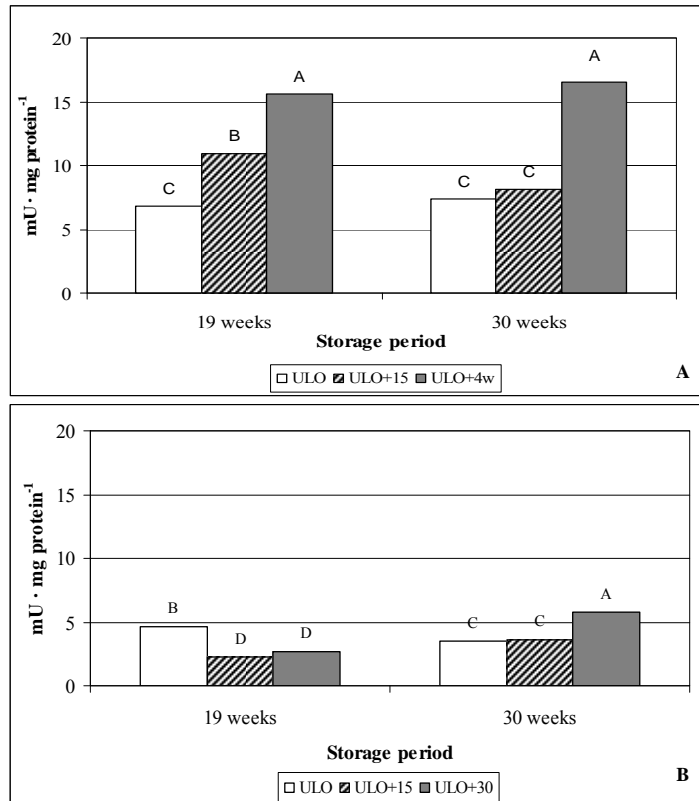


Figure 3. LOX (A) and HPL (B) activity in the flesh tissue of ‘Fuji Kiku[®] 8’ apples after cold storage plus 7 days at 20 °C. Values represent means of three replicates. Means showing different capital letters for a given enzyme activity are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

4. Acknowledgement

R. Altisent is a recipient of a grant from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain. This work was financed by INIA (project RTA2005-00050-00-00) and by Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (project AGL2006-00345/ALI).

5. References

- Altisent, R.; Graell, J.; Lara, I.; López, L.; Echeverría, G.** 2008. Regeneration of volatile compounds in 'Fuji' apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8490-8497.
- Bartley, I.** 1985. Lipid metabolism of ripening apples. *Phytochemistry*, 24, 2857-2859.
- Brackmann, A.** 1990. Possibilities of aroma improvement in apples during CA storage. In *XXIII International Horticultural Congress*; ISHS: Firenze, Italy, Abstracts; Vol.2, p 3316.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavor Ingredients*, 4th ed., CRC Press.
- CAMO ASA.** 1997. Unscrambler Users Guide, ver. 6.11^a. Programme Package for Multivariate Calibration. Trondheim, Norway.
- De Pooter, H. L.; Montens, J. P.; Willaert, G. A.; Dirinck, P. J.; Schamp, N. P.** 1983. Treatment of Golden Delicious apples with aldehydes and carboxylic acids: effect on the headspace composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 813-818.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A.** 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Temperature of hypoxic treatment alters volatile composition of juice from Fuji and Royal Gala apples. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 71-83.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004a. Aroma of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold-storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G.; Lara, I.; Fuentes, T.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004b. Assessment of relationships between sensory and instrumental quality of CA-stored 'Fuji' apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.
- Echeverría, G.; Fuentes, M. T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004c. Relationship between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation of 'Fuji' apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2004d. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.

- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavour regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 2000. Response of controlled atmosphere (CA) stored 'Golden Delicious' apples to the treatments with aroma precursors alcohols and aldehydes as aroma precursors. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 154-161.
- Harb, J.; Bisharat, R.; Streif, J.** 2008. Changes in volatile constituents of blackcurrants (*Ribes nigrum* L. cv. 'Titania') following controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 271-279.
- Ke, D.; Rodriguez-Sinobas, L.; Kader, A. A.** 1991. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 253-260.
- Ke, D.; Yahia, E. M.; Mateos, M.; Kader, A. A.** 1994. Ethanolic fermentation of 'Barlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 976-982.
- Kovats, E.** 1958. Gaschromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41, 1915-1932.
- Kreuzwieser, J.; Scheerer, U.; Rennenber, H.** 1999. Metabolic origin of acetaldehyde emitted by poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) trees. *Journal of Experimental Botany*, 50, 757-765.
- Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 29-39.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.
- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2007. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6087-6095.
- Lara, I.; Ortiz, A.; Echeverría, G.; López, M. L.; Graell, J.** 2008. Development of aroma-synthesising capacity throughout fruit maturation of 'Mondial Gala' apples. *The Journal of Horticultural Science and Biochemistry*, 83, 253-259.
- Lavilla, T.; Puy, J.; López, M. L.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Relationships between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in Granny Smith apple stored in different controlled atmosphere treatments by multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3791-3803.

- Li, D.; Xu, Y.; Sun, L.; Liu, L.; Hu, X.; Li, D.; Shu, H.** 2006. Salicylic acid, ethephon, and methyl jasmonate enhance ester regeneration in 1-MCP-treated apple fruit after long-term storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3887-3895.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998a. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Recasens, I.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998b. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by 'Starking Delicious' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 634-643.
- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley J. and Sons Eds.; Chichester, UK; pp. 116-165.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- 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.
- Pesis, E.; Marinansky, R.; Avissar, I.** 1989. Effect of prestorage treatments with acetaldehyde vapors or anerobic conditions on volatiles accumulation during storage of various fruits. *Acta Horticulturae*, 258, 661-667.
- Plotto, A.** 1998. Instrumental and sensory analysis of 'Gala' apple (*Malus domestica*, Borkh) aroma. Unpublished PhD Thesis. Oregon State University: Corvallis, Oregon, United States, p.193.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Poole, C. L.; Poole, S. K.** 1993. The Column in Gas Chromatography. In *Chromatography Today*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp. 176-181.
- Rowan, D. D.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M.** 1999. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2553-2562.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wyllie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.

- Sanz, C.; Olías, J. M.; Pérez, A. G.** 1997. Aroma Biochemistry of Fruits and Vegetables. In: *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*; Tomás-Barberán, F. A., Robins, R. J., Eds.; Clarendon Press: Oxford; pp 125-155.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Song, J.; Bangerth, F.** 2003. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 113-121.
- Souleyre, E. J. F.; Greenwood, D. R.; Friel, E. N.; Karunairetnam, S.; Newcomb, R. D.** 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv. 'Royal Gala'), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavour. *FEBS Journal*, 272, 3132-3144.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Vick, B. A.** 1991. A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids* 26, 315-320.
- Villatoro, C.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2008. Long-term storage of Pink Lady apples modifies volatile-involved enzyme activities: consequences on production of volatile esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9166-9174.
- Wyllie, S.; Fellman, J.** 2000. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3493-3496.
- Yahia, E. M.** 1994. Apple flavour. *Horticultural Reviews*, 16, 197-234.
- Young, J. C.; Chu, G.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.

CAPÍTULO 4

Evaluación de la influencia del estado de madurez en cosecha sobre la regeneración de compuestos volátiles y los atributos sensoriales en manzanas después del almacenamiento en atmósfera controlada ULO.

Rosa Altisent, Jordi Graell, Isabel Lara, Luisa López y Gemma Echeverría
Manuscrito en preparación

Resumen

Con el objetivo de conseguir una regeneración aromática en manzanas, en el presente trabajo se aplicó un periodo de permanencia de los frutos en frío después del almacenamiento en condiciones de muy bajo oxígeno (ULO), evaluándose, además, la influencia que sobre ello tenía el estado de madurez del fruto en cosecha. Se recolectaron frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ a los 182 y 195 días después de plena floración (ddpf) y frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, transcurridos 147 y 155 ddpf. Los frutos se almacenaron (a 1 °C y 93% de humedad relativa) en tres condiciones distintas: ULO (1% O₂:1% CO₂); ULO más 2 semanas en frío (ULO+2s); y ULO más 4 semanas en frío (ULO+4s) con un total de 19 y 30 semanas en conservación. Al cabo de 1 y 7 días (a 20 °C) después del almacenamiento, se analizaron los frutos determinándose los parámetros de calidad estándar, la producción de compuestos volátiles y la aceptación sensorial así como una serie de atributos sensoriales. Los resultados sugieren que el comportamiento de los frutos correspondientes a ambas cosechas fue muy parecido en cuanto a la emisión de compuestos volátiles. Aquellos frutos almacenados durante un periodo en frío mostraron un incremento en la concentración de aquellos compuestos volátiles que son característicos de la variedad, con respecto a aquellos frutos almacenados exclusivamente en condiciones ULO. Ambas cosechas también mostraron un comportamiento similar en los parámetros de calidad aunque cabe resaltar un descenso en los valores de firmeza y acidez más marcado para los frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’. Finalmente, en la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ se detectó en la cosecha tardía un descenso en la aceptación, jugosidad y sabor tras 30 semanas de conservación. En frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, también después de 30 semanas, una cosecha comercial permitió mantener más elevados los valores de acidez y firmeza.

Palabras clave: aceptación, atributos sensoriales, campañas, compuestos volátiles, parámetros de calidad,

1. Introducción.

Una estrategia clave para competir en el sector frutícola es disponer de frutos con una excelente calidad, entendiendo esta calidad en un sentido global que incluya aspectos comerciales, aspectos sanitarios, aspectos nutritivos-higiénicos, etc., y, sobre todo, aspectos organolépticos. En los países desarrollados, el consumidor desea, básicamente, unos frutos que presenten unos excelentes atributos organolépticos, que estén libres de residuos nocivos y que aporten los nutrientes necesarios para el organismo humano.

Entre las medidas posibles que se están abordando por parte del sector cabe señalar la introducción de nuevas variedades, que permiten diversificar la oferta varietal, tanto en cuanto a épocas de cosecha y de comercialización como de características de calidad más atractivas para el comprador-consumidor. Para asegurar el éxito de las nuevas variedades en el sector, se tiene que cumplir que sea correcta su adaptación productiva en las zonas de cultivo y que su frigoconservación no presente problemas técnicos. El presente trabajo se centra en dos variedades: ‘Golden Reinders®’ y ‘Fuji Kiku® 8’. La primera pertenece al grupo ‘Golden’, del que Europa es una gran zona productora (Kupferman, 2003), y la segunda pertenece al grupo ‘Fuji’, que si bien se produce poco en España, es previsible su crecimiento futuro dada la incorporación reciente de nuevos clones más adaptados a las condiciones agroclimáticas españolas. Tanto una como otra son variedades muy adecuadas para su almacenamiento en atmósfera controlada (AC), tecnología que se puede considerar no contaminante y segura, puesto que no implica la adición de sustancias químicas al fruto.

Si bien con las atmósferas con muy bajo nivel de oxígeno (ULO) se consigue que las manzanas presenten a la salida de cámara unos mayores valores de firmeza, de acidez y sólidos solubles, y una más alta coloración verde (provocado por un retraso en los procesos bioquímicos que tienen lugar en la maduración), hay una reducción de la producción total y de la emisión de ciertos compuestos aromáticos en los frutos (Hansen y col., 1992; Brackmann y col., 1993; Mattheis y col., 1991, 1995, 2005; Plotto y col., 1999, 2000; Dixon y Hewett, 2000; López y col., 1998, 2000; Fellman y col., 2000, 2003; Echeverría y col., 2004a, b, c). En consecuencia, estas manzanas presentan un aspecto externo excelente y una firmeza elevada, pero una cierta falta de atributos organolépticos como el sabor y el olor, tan importantes para la satisfacción de los

consumidores. Se han llevado a cabo diversos estudios para inducir un aumento en la concentración de volátiles a la salida de los frutos de las cámaras de conservación. Por ejemplo, se ha pretendido lograr una regeneración de volátiles con el tratamiento de los frutos mediante alcoholes y aminoácidos precursores (Rowan y col., 1996; Harb y col., 2000); aunque el resultado fue positivo, dicha técnica no es de fácil implantación práctica en las centrales frutícolas. Otros tratamientos consistentes en mantener los frutos un periodo adicional en condiciones de frío a la salida de la conservación en ULO (Plotto y col., 1999, 2000; Altisent y col., 2008), han resultado ser satisfactorios, consiguiendo la deseada regeneración aromática, si bien se debe optimizar su aplicación práctica.

El estado de madurez del fruto en la fecha de cosecha es otro factor crítico que afecta la maduración y el desarrollo de los compuestos volátiles a lo largo del periodo poscosecha (Fellman y col., 1993, 2000, 2003; Herregods y Goffings, 1994; Mattheis y Fellman, 1999; Echeverría y col., 2004d). Así, frutos inmaduros producen menos volátiles en cosecha y pierden la capacidad de reactivación de su metabolismo a lo largo del almacenamiento, especialmente tras largos periodos bajo condiciones de atmósfera controlada (AC) (Mattheis y col., 1991; Song y Bangerth, 1996; Fellman y col., 2003). El estado de madurez no sólo influye en la producción de volátiles en cosecha sino que también determina la regeneración de los compuestos volátiles después del almacenamiento en AC. A medida que la madurez en cosecha es mayor, disminuye el tiempo necesario para regenerar los compuestos volátiles hasta alcanzar un nivel óptimo tras el almacenamiento en AC (Fellman y col., 2003; Ferrandino y col., 2007). Un estudio realizado en las variedades ‘Fuji’ y ‘Golden Delicious’, en el que se recolectaron frutos en tres fechas distintas, siendo la intermedia la comercial, demostró que la cantidad total de compuestos volátiles aumentaba durante la maduración en ambas variedades (Mehinagic y col., 2006). Varias investigaciones han detectado diferentes concentraciones de volátiles en función del estado de madurez en manzanas ‘Golden Delicious’ (Song y Bangerth, 1996; Eccher-Zerbini y col., 1996, 1999; Ferrandino y col., 2001), ‘Fuji’ (Plotto y col., 1995; Eccher-Zerbini y col., 1999; Fellman y col., 2003; Echeverría y col., 2004b), y en otras variedades (Rizzolo y col., 2006; Moya-León y col., 2007).

En el presente estudio se pretende evaluar la influencia de dos estados de madurez en cosecha para las variedades ‘Fuji Kiku® 8’ y ‘Golden Reinders®’, además de dos

periodos adicionales en frío a la salida de la conservación en ULO sobre la regeneración aromática y la calidad estándar y sensorial de los frutos.

2. Materiales y métodos.

Material vegetal y condiciones de almacenamiento.

En el presente estudio se evaluó el comportamiento de dos variedades distintas de manzana, ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’. Ambas variedades fueron recolectadas en dos fechas distintas (comercial y tardía; dentro de la ventana comercial), en 2006, en la Estación Experimental de Lleida (IRTA). En el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, los árboles tenían 6 años de edad y las cosechas distaban 8 días entre si (C1: 147 ddpf; C2: 155 ddpf). Las manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ provenían de árboles de 5 años de edad y las cosechas distaron 11 días entre si (C1: 182 ddpf; C2: 193 ddpf). Inmediatamente después de la cosecha, 3 lotes de 100 kg de manzanas, para cada fecha de cosecha y variedad, fueron seleccionados por su uniformidad y ausencia de defectos, y almacenados a 1 °C y una humedad relativa del 92% en condiciones de atmósfera controlada con muy bajo nivel de oxígeno (ULO: 1% O₂:1% CO₂). Unos lotes se guardaron en condiciones ULO durante 19 o 30 semanas. Otros lotes se mantuvieron en ULO durante 17 o 28 semanas, y posteriormente se prolongó su almacenamiento durante 2 semanas en condiciones de frío normal (ULO+2s). Unos últimos lotes se almacenaron durante 15 o 26 semanas en ULO, seguido de 4 semanas en frío (ULO+4s). A la salida de las cámaras de almacenamiento, y al cabo de 1 y 7 días de permanencia a 20 °C, se determinó en los frutos la emisión de compuestos volátiles y los parámetros de calidad estándar. En la evaluación realizada a los 7 días a 20 °C, también se evaluaron los atributos sensoriales de los frutos (mediante un panel de jueces entrenados) y su aceptación organoléptica (por un panel de consumidores).

Análisis de los parámetros de calidad estándar.

Quince frutos por tratamiento (fecha de recolección × condiciones almacenamiento × período de almacenamiento × periodo a 20 °C) fueron individualmente analizados a la salida de la cámara para determinar sus valores de firmeza de pulpa, contenido en sólidos solubles, acidez titulable y color de fondo en la epidermis. Además de estos parámetros, en el momento de la cosecha se midieron el peso, el calibre y el índice de almidón. La firmeza de pulpa se midió en dos caras

opuestas en la zona ecuatorial del fruto, mediante un penetrómetro Effegi (FT 327; Effegi, Alfonsine, Italy) utilizando un pistón de 11 mm de diámetro, y los resultados se expresaron en N. El contenido en sólidos solubles (SS) y la acidez titulable (AT) fueron medidos en el zumo procedente de frutos enteros. El contenido en sólidos solubles fue medido mediante un refractómetro digital (Atago, Tokyo, Japan), y los resultados se expresaron en °Brix. Para determinar la acidez titulable, 10 mL de zumo se diluyeron con 10 mL de agua destilada y se valoraron con solución de NaOH 0,1 N hasta un pH de 8,2 utilizando fenoftaleína, y expresando el resultado en gramos de ácido málico L⁻¹. El color de fondo en la epidermis se determinó en la zona ecuatorial del fruto mediante un colorímetro triestímulo (Chroma Meter CR-200, Minolta Corp, Osaka, Japan) con un iluminante D₆₅ y un diámetro de apertura de 8 mm, expresándose los resultados en coordenadas colorimétricas del espacio CIELab, a partir de las cuales se calculaba el valor del tono ($\arctg b^*/a^*$). El índice de almidón se determinó bañando una mitad del fruto con una solución de yodo (15 g KI + 6 g I₂ por litro) durante 30 s y observando el porcentaje de la superficie de pulpa teñida de color azul-violeta, expresándose los resultados según una escala de 1-10 (1= 100% de almidón, 10= sin presencia de almidón).

Análisis de compuestos volátiles.

Se tomaban ocho kilogramos de manzanas (2 kg/repetición × 4 repeticiones) por tratamiento (fecha de recolección × condiciones de almacenamiento × periodo de almacenamiento × periodo de permanencia a 20 °C) para el análisis de los compuestos volátiles. Se colocaban frutos enteros en urnas Pirex de 8 L a través de las cuales circulaba una corriente de aire (900 mL min⁻¹) durante 4 h. El efluente gaseoso resultante era recogido en tubos de adsorción (ORBO-32™; SUPELCO, Bellefonte, PA) rellenos con 100 mg de carbón activo (20/40 mezcla). Los compuestos volátiles fueron desadsorbidos por agitación durante 40 minutos con 0,5 mL de dietiléter. Para la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 series II (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipado con un detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando como fase estacionaria una columna entrecruzada de ácidos grasos libres (FFAP; 50 m × 0.2 mm i.d. × 0.33 μm) en la cual se incorporó un volumen de 1 μL del extracto. La temperatura del horno fue fijada en 70 °C (1 min). El rango de temperatura se situó, en primer lugar, en 3 °C/min hasta 142 °C y después en 5 °C min⁻¹ hasta 225 °C. Posteriormente, se mantuvo esta

segunda temperatura durante 10 minutos. Se utilizó helio como gas portador, con un flujo de 0.8 mL min^{-1} (42 cm s^{-1}), con un 'split' de 40:1. La temperatura del inyector y del detector se fijaron en $220 \text{ }^\circ\text{C}$ y $240 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención con aquellos estándares y añadiendo uno a uno cada compuesto en la muestra. La cuantificación se llevó a cabo mediante la adición de $25 \text{ } \mu\text{L}$ de solución 0.2% de butilbenzeno ($>99.5 \%$, Fluka) como estándar interno. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (5973N) para la confirmación de los compuestos utilizando la misma columna capilar que en los análisis descritos anteriormente. El espectro de masas fue obtenido en 'full scan', variando entre $30\text{-}500 \text{ amu}$, con un ratio de 3.1 scans s^{-1} . El espectro se obtuvo mediante ionización por impacto de electrones a 70 eV . Como gas portador se utilizó helio (42 cm s^{-1}), con el mismo gradiente de temperatura descrito anteriormente. Los resultados del espectrofotómetro fueron registrados (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) y comparados con aquellos descritos en la librería NIST HP59943C. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Análisis sensorial

Al final de cada periodo de almacenamiento, se extrajeron frutos de cada atmósfera de almacenamiento y se mantuvieron durante 7 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (para simular el periodo de vida comercial), efectuándose en ese momento su valoración sensorial. Para este propósito se utilizaron quince frutos por tratamiento (fecha de recolección \times condiciones de almacenamiento \times periodo de almacenamiento) Previa a la valoración por parte de los consumidores, se midió instrumentalmente la firmeza en los frutos, extrayéndose posteriormente dos porciones de los mismos para analizar el contenido de SS y la AT; el resto del fruto fue dividido en piezas para ser utilizadas en la evaluación por los consumidores. Se colocaban tres piezas de frutos, correspondientes a cada atmósfera, en platos blancos, y se presentaban inmediatamente a un panel de 50 consumidores para su evaluación sensorial. El panel fue el mismo para todas las evaluaciones realizadas (distintas fechas de recolección y periodos de almacenamiento). Los consumidores eran personas voluntarias procedentes del personal del centro UdL-IRTA y estudiantes de la Universidad de Lleida. Todos los participantes eran consumidores habituales de manzanas. Cada pieza de fruta fue identificada mediante un código aleatorio de 3 dígitos. El orden de presentación de las piezas presentadas fue aleatorio para cada consumidor. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en cabinas

individuales bajo iluminación blanca y a temperatura ambiente. Cada consumidor valoró las tres muestras y se le pidió que indicara su grado de aceptación o desagrado utilizando una escala hedónica de 9 puntos (1= me disgusta mucho; 9= me gusta mucho). Las muestras podían ser probadas por los consumidores tantas veces como considerasen necesario.

Para la evaluación sensorial de los frutos mediante un panel de jueces entrenados, se entrenó a nueve panelistas para evaluar la fruta (de acuerdo con ISO 1993, no. 8586-1). El proceso de entrenamiento incluyó 15 sesiones de 1,5 h cada una. A lo largo del entrenamiento, los panelistas fueron informados de las puntuaciones de los atributos por el resto del grupo para así asegurar la consistencia en el panel. Se evaluaron la intensidad en dulzor, acidez, crocancia, firmeza, jugosidad, harinosidad y sabor a manzana. La intensidad de cada atributo se marcó en una escala no estructurada de 150 mm, con los límites en 0 = ausencia y 150 = extremo, con la excepción de la firmeza, en la cual se establecieron los límites en 10 = baja y 140 = alta. Los distintos atributos valorados fueron definidos según Harker y col. (2002a, b). Las evaluaciones tuvieron lugar en el Laboratorio de Análisis Sensorial del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida. El entorno de las cabinas estaba a temperatura ambiente. Se facilitaba a los jueces la posibilidad de tomar agua mineral y galletas 'cracker' para la limpieza del paladar entre muestras. Los resultados se anotaron en hojas de evaluación. Todos los panelistas analizaron todas las muestras. El orden de las muestras fue aleatorio mediante un diseño equilibrado en bloques. Los frutos procedentes de cada atmósfera y periodo de almacenamiento se presentaron a los panelistas en vasos de plástico blanco. Estos fueron identificados mediante un código de tres dígitos, generado de forma aleatoria.

Análisis estadístico.

En el planteamiento de las experiencias se utilizó un diseño multifactorial, siendo los factores analizados: fecha de cosecha, atmósfera de almacenamiento, periodo de almacenamiento y periodo a 20 °C. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y test LSD ($p \leq 0,05$), utilizando el programa Statistical Analyses System (SAS, 1998).

3. Resultados y discusión

Parámetros de calidad en cosecha y a la salida del almacenamiento.

Las Tablas 1 y 2 muestran los parámetros de calidad de manzanas ‘Golden Reinders[®]’ y ‘Fuji Kiku[®] 8’ en el momento de cosecha. Para los frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’ se observaron diferencias significativas en el calibre y el índice de almidón, siendo éstos superiores para una cosecha más tardía (C2), mientras que los atributos de firmeza y acidez fueron significativamente menores. Para los frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ no se observaron tantas diferencias entre ambas cosechas; únicamente en el índice de almidón y el contenido en sólidos solubles, los valores fueron mayores para C2 (mientras que el color de fondo fue menor, denotando así una mayor coloración amarilla para dichos frutos). Echeverría y col. (2004a) recomendaron el color de fondo y el índice de almidón como buenos indicadores del estado de madurez en manzanas ‘Fuji’. También, Alegre y Casals (2006) recomendaron para ‘Golden Delicious’ el índice de almidón como parámetro óptimo para determinar el periodo de cosecha.

Tabla 1. Parámetros de calidad de manzanas ‘Golden Reinders[®]’ en dos fechas de cosecha (C1=147 ddpf; C2=155 ddpf).

	Cosecha 1	Cosecha 2
Peso (g)	236,4 A	225,1 A
Calibre (mm)	74,5 B	80,2 A
Índice de almidón (1-10)	4,5 B	5,7 A
Firmeza (N)	73,1 A	67,1 B
Sólidos Solubles (°Brix)	13,3 A	13,7 A
Acidez (g L ⁻¹)	5,4 A	3,6 B
Color de epidermis	108,3 A	109,7 A

Los valores medios para cada parámetro seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

Tabla 2. Parámetros de calidad de manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ en dos fechas de cosecha (C1=182 ddpf; C2=193 ddpf).

	Cosecha 1	Cosecha 2
Peso (g)	282,1 A	274,8 A
Calibre (mm)	89,6 A	88,5 A
Firmeza (N)	69,3 A	70,8 A
Índice de almidón (1-10)	6,3 B	8,3 A
Sólidos Solubles (°Brix)	16,3 B	17,2 A
Acidez (g L ⁻¹)	2,9 A	2,9 A
Color de epidermis	96,4 A	67,8 B

Los valores medios para cada parámetro seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

Si bien otros autores han estudiado el efecto de un periodo de permanencia en frío a la salida del almacenamiento en condiciones ULO sobre la composición de la fracción volátil de los frutos, pocos han estudiado su efecto adicional sobre los parámetros de calidad estándar. Seguidamente se detalla el efecto de dicho almacenamiento sobre la firmeza, el contenido en sólidos solubles, la acidez y el color (para ambas variedades). Los valores de los parámetros de calidad después de frigoconservación se muestran en las Tablas 3 y 4.

Para los frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’ se observó que, en general, no existían diferencias en cuanto al contenido de sólidos solubles en ambas cosechas, en los distintos periodos de conservación y en los distintos periodos de permanencia a 20 °C; los valores se mantuvieron en todos los casos por encima de 14 °Brix, superando el valor de 12 °Brix considerado el mínimo para satisfacer al consumidor de manzanas ‘Golden Delicious’ (Hoehn y col., 2003; DeEll y col., 2001). Sí que se observaron diferencias en los valores de firmeza y acidez. En primer lugar, si nos centramos en los valores de firmeza podemos observar que no existieron diferencias entre cosechas, a excepción de aquellos frutos almacenados en ULO y ULO+2s después de de cortos periodos de conservación y 1 día de permanencia a 20 °C que la firmeza fue superior para frutos de C1. En general, no se observaron diferencias a causa de las distintas atmósferas al cabo de 7 días de permanencia a 20 °C (vida comercial) mientras que a 1 día los frutos almacenados en ULO+4s mostraron un ligero descenso con respecto a aquellos almacenados en ULO. De un modo general, las diferencias entre periodos de almacenamiento también se observaron al cabo de 1 día de permanencia a 20 °C, para ambas cosechas. En el caso más desfavorable, correspondiente a frutos de C2 tras largos almacenamientos en atmósfera ULO+4s y 7 días a 20 °C, los valores de firmeza llegaron a 61,5 N. Según Hoehn y col. (2003), la aceptación mínima de manzanas ‘Golden Delicious’ se produce a partir de un valor de 44 N; en nuestro estudio, en todos los casos los valores superan dicho valor mínimo recomendado. Además, otro estudio en ‘Golden Delicious’ mostró que a medida que aumentaba el valor de firmeza aumentaba su aceptación hasta llegar a un valor de 62N a partir del cual, la aceptación no mejoraba (Harker y col., 2008). Por lo que se refiere a la acidez titulable de los frutos, los frutos de C2, que en cosecha presentaban unos valores similares a C1, a la salida de frigoconservación tenían unos valores significativamente menores. Las mayores diferencias causadas por las distintas atmósferas se detectaron al cabo de 30

semanas de almacenamiento (para ambas cosechas), momento en que los frutos conservados en ULO presentaban mayor acidez que los frutos conservados en ULO+2s y ULO+4s.

En el caso de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, al igual que para ‘Golden Reinders[®]’, no existieron diferencias en cuanto al contenido de sólidos solubles para ambas cosechas, atmósferas, periodos de conservación y periodo a 20 °C. Estudios previos han mostrado que la aceptación de manzanas ‘Fuji’ es principalmente dependiente de los valores de firmeza sin que tenga influencia el contenido en sólidos solubles (Harker y col., 2008). En general, en nuestro estudio, los valores de firmeza fueron muy parecidos en ambas cosechas, atmósferas y periodos de almacenamiento a excepción de aquellos frutos almacenados en atmósfera ULO a la salida de conservación (19 y 30 semanas) y a 1 día a 20 °C que presentaban unos valores superiores a aquellos conservados en ULO+2s y ULO+4s. Cabe destacar que el valor mínimo en firmeza se situó en 69,7 N en el caso más desfavorable (correspondiente a frutos de C2 y 7 días de permanencia a 20 °C, para la atmósfera ULO+4s). Según un estudio realizado en distintas variedades como ‘Gala’, ‘Fuji’, ‘Braeburn’ y ‘Golden Delicious’, se postuló un valor de 62 N como el óptimo para conseguir satisfacer a los consumidores (Harker y col., 2008); en todos los casos de nuestro estudio, los valores de firmeza se mantuvieron superiores a dicho valor recomendado. En general, las diferencias causadas por el tipo de atmósferas, los periodos de almacenamiento y el periodo a 20 °C se manifestaban para cortos almacenamientos y para frutos de C1, mientras que para almacenamientos más largos así como para frutos de C2, no se observaron tales diferencias. Fijándonos en la acidez de los frutos, se puede observar que, en general, para cortos periodos de conservación, los frutos conservados en ULO mantuvieron unos valores superiores al resto; estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Echeverría y col. (2004b) en que la atmósfera 1% O₂:1% CO₂ era la más eficiente (entre otras que ensayaron) en preservar la acidez de las manzanas ‘Fuji’.

Tabla 3. Parámetros de calidad de manzanas ‘Golden Reinders[®]’, obtenidos en dos fechas de recolección (C1=147 ddpf; C2=155 ddpf) y almacenadas en tres condiciones de atmósfera (ULO; ULO+2s; ULO+4s) con un total 19 y 30 semanas de conservación más 1 y 7 días de permanencia a 20°C.

Atmósfera	Cosecha	Período almacenamiento	Días a 20°C	SS (°Brix)	Acidez (g/L)	Firmeza (N)	Color (tono)
ULO	1	19 semanas	1	15,7 B	4,8 B	70,0 B	109,2 C
			7	15,7 B	4,6 BC	66,7 C	106,2 EF
		30 semanas	1	16,5 A	5,2 A	68,5 BC	85,6 I
			7	15,6 BC	4,6 BC	66,2 CD	85,9 HI
	2	19 semanas	1	14,5 D	3,7 D	75,8 A	110,2 B
			7	15,4 BC	3,1 EF	68,1 BC	108,8 CD
		30 semanas	1	15,4 BC	4,4 C	69,9 B	86,4 HI
			7	15,8 B	3,0 EF	66,4 CD	87,4 GH
ULO+2s	1	19 semanas	1	14,8 CD	4,9 AB	70,4 B	111,3 A
			7	15,4 BC	4,8 B	64,1 CD	106,4 E
		30 semanas	1	15,6 BC	5,1 AB	66,0 CD	85,5 I
			7	15,6 BC	4,3 C	64,1 CD	86,3 HI
	2	19 semanas	1	15,2 C	3,3 E	73,7 A	111,2 A
			7	15,6 BC	3,2 EF	68,2 BC	107,9 D
		30 semanas	1	15,2 C	3,7 D	64,7 CD	86,7 H
			7	15,4 BC	3,1 EF	62,0 D	87,1 GH
ULO+4s	1	19 semanas	1	14,7 D	4,8 B	70,4 B	110,9 AB
			7	15,5 B	4,3 C	62,6 D	105,3 F
		30 semanas	1	15,5 BC	4,5 BC	63,3 D	85,9 HI
			7	15,0 CD	3,8 D	63,2 D	86,5 HI
	2	19 semanas	1	14,7 D	3,3 E	68,3 BC	110,0 BC
			7	15,1 CD	3,7 D	64,8 CD	106,2 EF
		30 semanas	1	15,2 C	2,9 F	63,5 D	87,4 GH
			7	15,0 CD	2,4 G	61,5 D	87,7 H

Los valores medios para cada parámetro seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

Si comparamos ambas variedades, el contenido de sólidos solubles fue mayor, en general, en los frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ (tanto en cosecha como después del almacenamiento), mientras que los valores de acidez se mantuvieron superiores (en ambos momentos) en los frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’. En relación a los valores de firmeza, éstos se mantuvieron similares tanto en cosecha como al final de la frigoconservación, para ambas variedades, aunque cabe resaltar una ligera diferencia al alza para las manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’.

Si nos fijamos en los valores de tono (color de fondo) de las manzanas ‘Golden Reinders[®]’, se observaron ligeras diferencias entre ambas cosechas y para las distintas atmósferas de almacenamiento. Por lo contrario, sí que cabe resaltar las diferencias obtenidas a causa de los dos periodos de almacenamiento ensayados, siendo los frutos que habían permanecido durante 30 semanas en conservación, para ambas cosechas, los

que presentaron una coloración más amarilla (valores de tono inferiores), por tanto, un estado de madurez más avanzado. En el caso de ‘Fuji Kiku® 8’ no se observaron diferencias de tono a excepción de aquellos frutos procedentes de C2, en los que las condiciones ULO+2s y ULO+4s provocaron una coloración más amarillenta en la epidermis.

Tabla 4. Parámetros de calidad de manzanas ‘Fuji Kiku® 8’ obtenidos en dos fechas de recolección (C1=182 ddpf; C2=193 ddpf) y almacenadas en tres condiciones de atmósfera (ULO; ULO+2s; ULO+4s) con un total 19 y 30 semanas de conservación más 1 y 7 días de permanencia a 20°C.

Atmósfera	Cosecha	Período almacenamiento	Días a 20°C	CSS (°Brix)	Acidez (g L ⁻¹)	Firmeza (N)	Tonalidad			
ULO	1	19 semanas	1	17,6 BC	2,8 BC	88,9 A	102,66 A			
			7	17,8 B	3,2 A	81,3 BC	99,19 AB			
	2	19 semanas	1	17,3 BC	2,9 B	78,9 C	101,13 AB			
			7	17,7 BC	2,5 CD	78,2 CD	95,54 BC			
		30 semanas	1	17,6 BC	3,0 AB	82,0 BC	94,33 BC			
			7	18,6 A	3,0 AB	81,0 BC	96,20 BC			
ULO+2s	1	19 semanas	1	16,3 D	2,1 DE	74,4 D	100,01 AB			
			7	16,6 CD	1,9 E	71,1 DE	93,42 BC			
		30 semanas	1	17,4 BC	2,8 BC	83,8 B	96,85 B			
			7	17,6 BC	2,8 BC	74,1 D	94,04 BC			
			1	16,9 CD	2,3 D	76,1 CD	102,77 A			
			7	17,3 BC	2,3 D	77,3 CD	100,48 AB			
	2	19 semanas	1	17,4 BC	2,7 BC	78,1 CD	91,94 BC			
			7	17,5 BC	2,8 BC	74,2 D	87,66 C			
		30 semanas	1	16,5 CD	2,3 D	71,9 DE	93,78 BC			
			7	17,0 C	2,1 DE	70,7 DE	93,10 BC			
			ULO+4s	1	19 semanas	1	17,2 C	2,7 BC	81,9 BC	94,97 BC
						7	16,7 CD	2,8 BC	73,3 DE	93,87 BC
30 semanas	1	15,9 D		2,6 CD	75,5 CD	102,16 AB				
	7	16,8 CD		2,4 CD	77,0 CD	90,90 C				
	2	19 semanas		1	17,5 BC	2,6 C	78,5 CD	87,29 C		
				7	17,5 BC	2,4 CD	73,7 DE	86,96 C		
30 semanas	1	16,8 CD	2,2 DE	71,7 DE	91,26 C					
	7	16,7 CD	1,9 E	69,7 E	91,99 BC					

Los valores medios para cada parámetro seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

Compuestos volátiles en cosecha y después del almacenamiento.

En la Tabla 5 se muestra los índices de retención así como los umbrales olfativos para aquellos compuestos volátiles presentes en el momento de cosecha así como después del almacenamiento de los frutos.

Tabla 5. Compuestos volátiles emitidos en cosecha por manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’, los valores de sus índices de retención y sus umbrales olfativos.

Compuestos volátiles	RI ^a	OTH ^b
Acetato de metilo	854	8300(a)
Acetato de etilo	882	13500 (b)
Etol	912	62450 (c)
Propanoato de t-butilo	928	19 (a)
Acetato de propilo	945	2000 (d)
Butanoato de metilo	955	76 (e)
Acetato de 2-metilpropilo	976	65 (f)
1-Propanol	992	9000 (g)
Butanoato de etilo	1002	1 (c)
Propanoato de propilo	1008	57 (g)
2-Metilbutanoato de etilo	1015	0,006 (f)
Acetato de butilo	1040	66 (d)
Propanoato de 2-metilpropilo	1046	-
2-Metil-1-propanol	1054	250 (h)
Acetato de 2-metilbutilo	1096	11 (f)
1-Butanol	1119	500 (g)
Propanoato de butilo	1123	25 (g)
2-metilpropanoato de butilo	1129	80 (e)
Butanoato de 2-metilpropilo	1140	-
Acetato de pentilo	1161	43 (d)
Propanoato de 2-metilbutilo	1180	19 (a)
2-metilpropanoato de 2-metilbutilo	1183	-
2-metil-1-butanol	1199	250 (c)
Butanoato de butilo	1218	100 (e)
2-metilbutanoato de butilo	1235	17 (e)
Hexanoato de etilo	1239	1 (f)
Propanoato de pentilo	1247	-
1-Pentanol	1262	4000 (h)
Acetato de hexilo	1292	2 (h)
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	1300	-
2-Heptanol	1350	-
Hexanoato de propilo	1353	-
Propanoato de hexilo	1379	8 (i)
1-Hexanol	1392	500 (h)
Hexanoato de 2-metilpropilo	1399	-
Hexanoato de butilo	1473	700 (e)
Butanoato de hexilo	1477	250 (f)
2-metilbutanoato de hexilo	1488	6 (e)
Octanoato de etilo	1499	-
2-Etil-1-hexanol	1565	270000 (j)
Hexanoato de pentilo	1590	-
Hexanoato de hexilo	1687	64000 (k)
Octanoato de butilo	1690	-
Octanoato de hexilo	1840	-

^a Kovats retention index in cross-linked FFAP column (Poole y Poole, 1993). ^b Odour threshold ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in water reported in ref (a) (Schnabel y col., 1988), (b) (Takeoka y col., 1992), (c) (Rychlik y col., 1998), (d) (Takeoka y col., 1996), (e) (Takeoka y col., 1990), (f) (Takeoka y col., 1992), (g) (Flath y col., 1967), (h) (Buttery, 1993), (i) (Van Gemert y Nettenbreijer, 1977), (j) (Fazzalari, 1978), (k) (Burdock, 2002).

En la Tabla 6 se muestra los compuestos volátiles emitidos por los frutos de cada variedad estudiados en ambas fechas de recolección. Entre paréntesis, se presenta el logaritmo positivo de las correspondientes unidades de olor calculado mediante el ratio de la concentración dividido por su umbral olfativo (Baldwin y col., 2000).

Tabla 6. Compuestos volátiles obtenidos en dos fechas de recolección en las variedades ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’. Entre paréntesis se presentan los logaritmos positivos de la unidad de olor.

Compuestos volátiles	Fuji Kiku [®] 8		Golden Reinders [®]	
	Cosecha 1	Cosecha 2	Cosecha 1	Cosecha 2
Acetato de metilo	11,7	11,7	6,0 B	12,3 A
Acetato de etilo	33,8 B	40,6 A	27,4	38,9
Etanol	21,3	28,5	14,6	22,5
Propanoato de t-butilo	10,4 A	5,9 B	nd	nd
Acetato de propilo	8,5 B	25,2 A	5,4	7,1
Butanoato de metilo	nd	nd	1,6 B	15,0 A
Acetato de 2-metilpropilo	3,3 B	10,3 A	0,8	1,3
1-Propanol	5,2	15,3	1,1	1,8
Butanoato de etilo	1,3 (0,1)	3,8 (0,6)	Trazas	Trazas
Propanoato de propilo	2,2 B	26,9 A	nd	nd
2-Metilbutanoato de etilo	3,7 (2,8)	8,5 (3,1)	42,1 (3,8)	41,0 (3,8)
Acetato de butilo	28,4 B	88,3 A (0,1)	3,6 B	35,1 A
Propanoato de 2-metilpropilo	1,0 A	nd	nd	nd
2-Metil-1-propanol	1,8 B	6,8 A	1,8	1,5
Acetato de 2-metilbutilo	170,7 B (1,2)	651,6 A (1,8)	12,8 (0,1)	27,6 (0,4)
1-Butanol	11,0 B	55,0 A	1,6 B	11,2 A
Propanoato de butilo	2,4 B	6,6 A	1,1	1,5
2-Metilpropanoato de butilo	1,9 B	26,4 A	Trazas	1,4A
Butanoato de 2-metilpropilo	nd	1,2 A	5,5	0,6
Acetato de pentilo	4,7 B	18,7 A	5,9	6,3
Propanoato de 2-metilbutilo	3,0 B	33,3 A (0,2)	0,7	1,1
2-Metilpropanoato de 2-metilbutilo	nd	1,5 A	nd	nd
2-Metil-1-butanol	16,2 B	66,1 A	1,4	2,1
Butanoato de butilo	3,8 B	14,9 A	2,1	3,2
2-metilbutanoato de butilo	4,4 B	56,2 A (0,5)	1,4	4,3
Propanoato de pentilo	nd	4,7 A (0,7)	nd	nd
Hexanoato de etilo	nd	nd	0,7	1,1 (0,1)
1-Pentanol	1,2	2,5	2,0	1,1
Acetato de hexilo	73,0 (1,6)	89,0 (1,6)	30,3 (1,2)	67,1 (1,5)
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	2,4 B	35,4 A	nd	nd
2-Heptanol	4,2 B	19,2 A	nd	nd
Hexanoato de propilo	1,0 B	4,8 A	0,6	0,8
Propanoato de hexilo	5,2 B	22,3 A (0,4)	3,3	2,1
1-Hexanol	7,6	2,7	13,2	6,0
Hexanoato de 2-metilpropilo	1,2	2,1	2,0	1,4
Hexanoato de butilo	15,7 B	81,8 A	0,9	8,6
Butanoato de hexilo	9,4	20,1	9,8	10,6
2-metilbutanoato de hexilo	21,5 B (0,5)	128,7 A (1,3)	15,3 (0,4)	17,2 (0,5)
Octanoato de etilo	nd	nd	5,5	4,4
2-Etil-1-hexanol	3,7	2,0	13,5	11,2
Hexanoato de pentilo	2,9 B	11,4 A	1,3	1,7
Hexanoato de hexilo	9,4 B	28,4 A	5,8	8,0
Octanoato de butilo	nd	4,1 A	2,2	2,8
Octanoato de hexilo	nd	11,1 A	5,7	7,5

Los valores medios para cada compuesto volátil y variedad seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0,05$ (LSD test). Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

En el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, en ambas cosechas se detectó un total de 37 compuestos volátiles (29 ésteres y 8 alcoholes), en los frutos de ambas cosechas. Entre éstos, cabe destacar el acetato de etilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo, que representaron un 50 % de la concentración total de volátiles en el momento de cosecha (para ambas fechas). No existieron diferencias significativas entre las dos cosechas: C1 (256,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y C2 (388,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$), según un valor de LSD = 126,0. Otro trabajo en manzanas ‘Golden Delicious’ mostró que la fecha de cosecha afecta la acumulación de volátiles, en el que los frutos procedentes de una cosecha precoz o comercial mostraban un mayor contenido en ésteres mientras que aquellos frutos recolectados más tardíamente eran más ricos en alcoholes (Ferrandino y col., 2001). Entre aquellos compuestos que presentaron un valor positivo del logaritmo de la unidad de olor (y que por tanto son considerados compuestos característicos del aroma de la variedad) destacaron el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, el 2-metilbutanoato de butilo, el hexanoato de etilo, el acetato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo. En otros estudios referidos a manzanas ‘Golden Delicious’, destacaban en cosecha los compuestos: acetato de etilo, propanoato de etilo, acetato de propilo, acetato de 2-metilpropilo, 2-metilbutanoato de etilo, acetato de butilo y acetato de 2-metilbutilo (López y col., 2000).

En el momento de cosecha, los frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ recolectados en fecha comercial presentaron un total de 36 compuestos volátiles (27 ésteres y 9 alcoholes). En los frutos de la cosecha tardía (C2), hubo un aumento de 5 ésteres con respecto a C1: butanoato de 2-metilpropilo, 2-metilpropanoato de 2-metilbutilo, propanoato de pentilo, octanoato de butilo y octanoato de hexilo. Entre los compuestos emitidos cabe destacar cuantitativamente el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo, el 2-metilbutanoato de hexilo, el hexanoato de butilo y el butanoato de hexilo, que en conjunto representaban un 63 % de la fracción volátil, para las dos fechas de recolección. Los frutos procedentes de la C2 presentaron una mayor concentración total de volátiles (C1= 505,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$; C2= 1673,85 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LSD= 410,8), así como un mayor contenido de la mayoría de los compuestos característicos del olor en manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’. Aquellos compuestos que presentaron un valor positivo del logaritmo de la unidad de olor fueron: el butanoato de etilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo y el 2-

metilbutanoato de hexilo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores para la misma variedad (Echeverría y col., 2004a).

En las Figuras 1 y 2 se muestran la emisión total de compuestos volátiles para ambas variedades en ambas fechas de recolección. En ambas variedades el comportamiento entre cosechas fue muy parecido. En la variedad ‘Golden Reinders’[®] (Figura 1) se observó una tendencia muy similar entre ambas cosechas a excepción de aquellos frutos almacenados durante 30 semanas y después de 7 días a 20 °C, cuando los frutos procedentes de C1 mostraron mayor concentración de volátiles que aquellos procedentes de C2. En general, al cabo de 1 día a 20 °C no se produjeron diferencias a causa del tipo de atmósfera y tampoco a causa del periodo de conservación (para ambas cosechas). En cambio, al cabo de 7 días de vida comercial sí se observaron diferencias a causa de las diferentes atmósferas y periodos de conservación. Se puede observar que para cortos periodos de almacenamiento y 7 días a 20 °C, la atmósfera más eficaz para aumentar la emisión de volátiles fue ULO+4s. Al cabo de 30 semanas de conservación y 7 días a 20 °C, los frutos de C1 que más destacaron en cuanto a emisión de volátiles fueron los frutos almacenados en ULO+2s; por otro lado, para los frutos de C2 fueron tanto la atmósfera ULO+2s como ULO+4s las que permitieron un mayor aumento de volátiles con respecto a ULO.

En el caso de la variedad ‘Fuji Kiku’[®] 8’ (Figura 2) se observó que los frutos de C1 y sometidos a las condiciones ULO+4s presentaron una mayor concentración de volátiles que aquellos almacenados en ULO, aunque las diferencias sólo eran significativas en la evaluación de 19s + 1d y 30s + 7d. No existieron diferencias significativas a causa de los distintos periodos de almacenaje y de permanencia a 20 °C. No existieron diferencias significativas entre las dos cosechas. En el caso de los frutos de C2 no existieron diferencias significativas a causa de las atmósferas, a excepción de la evaluación realizada al cabo de 19 semanas y después de 1 día a 20 °C, momento en que los frutos almacenados en ULO presentaron una menor concentración de volátiles que aquellos sometidos a las condiciones ULO+2s y ULO+4s.

Plotto y col. (1999) llevaron a cabo un estudio almacenando manzanas ‘Gala’ en condiciones de atmósfera 1% O₂:1% CO₂ durante 16 semanas con un periodo adicional de 4 semanas en frío (21% O₂:0,03% CO₂). Este estudio mostró un aumento de la concentración de ésteres totales almacenados en estas condiciones respecto a la conservación durante 20 semanas en condiciones únicamente de 1% O₂:1% CO₂.

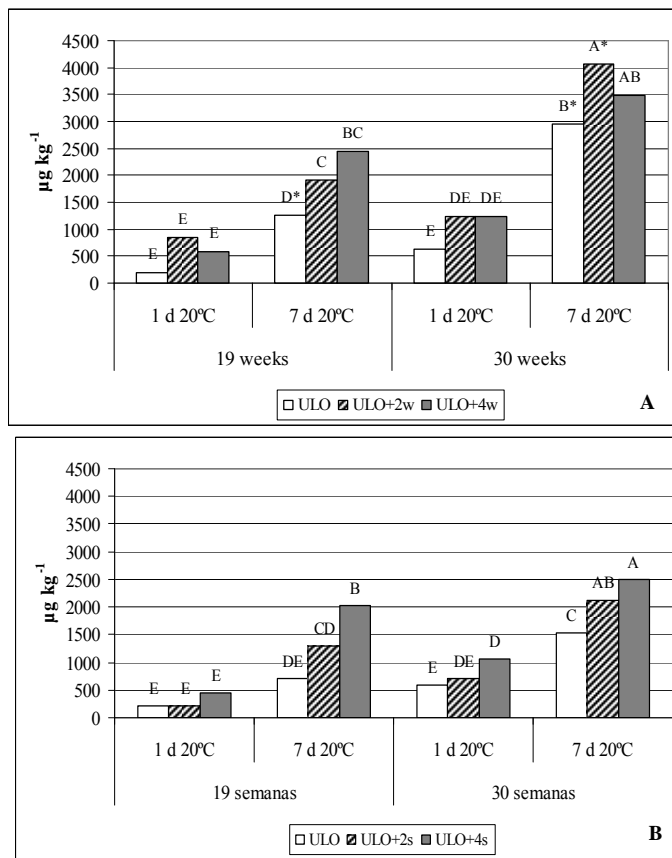


Figura 1. Emisión total de compuestos volátiles en manzanas ‘Golden Reinders[®]’, procedentes de cosecha 1 (A) y cosecha 2 (B), después de 19 y 30 semanas de almacenamiento más 1 y 7 días de permanencia a 20 °C. Los valores medios para cada cosecha seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

Con relación a la tipología de los compuestos volátiles detectados en frutos de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, se identificó un total de 42 compuestos volátiles. En general, para ambas cosechas, los frutos procedentes de un periodo adicional de 7 días a 20 °C mostraron unos valores de concentración muy superiores a aquellos correspondientes a 1 día, y, a la vez, la producción de volátiles fue superior en el caso de largos periodos de almacenamientos (datos no mostrados). En las Tablas 7-10 se muestran las diferencias existentes con motivo del tipo de atmósfera (objetivo principal de nuestro estudio) para ambas cosechas, los distintos periodos de almacenamiento y los distintos periodos de permanencia a 20°C. Por otro lado, los frutos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ no presentaron diferencias en la concentración de los compuestos a causa de los días de permanencia a 20 °C (Tablas 11-14). Además, se observó un

comportamiento distinto entre las dos cosechas y los distintos periodos de conservación. Así, para la cosecha comercial (C1), el alargar el periodo de conservación provocó un aumento en la concentración de volátiles, mientras que, para una cosecha más tardía (C2), este alargamiento provocó una disminución del contenido total (datos no mostrados); también se produjeron diferencias significativas a causa del tipo de atmósfera de almacenamiento (Tablas 11-14).

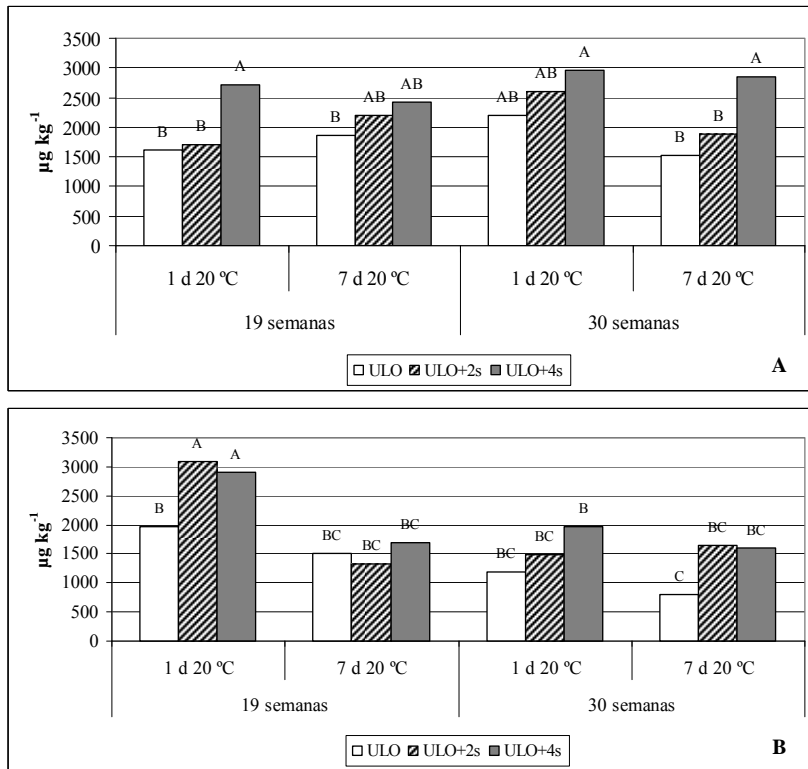


Figura 2. Emisión total de compuestos volátiles en manzanas ‘Fuji Kiku® 8’ procedentes de cosecha 1 (A) y cosecha 2 (B), después de 19 y 30 semanas de almacenamiento más 1 y 7 días de permanencia a 20 °C. Los valores medios para cada cosecha seguidos por distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ (test LSD).

De todos los compuestos detectados en la variedad ‘Golden Reinders®’, 9 de ellos presentaron valor positivo del logaritmo de la unidad de olor, mayoritariamente al cabo de 7 días de permanencia a 20 °C, coincidiendo con una mayor concentración del compuesto. Estos compuestos fueron: el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el 2-metilbutanoato de butilo, el acetato de hexilo, propanoato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo; además, al cabo de 30 semanas de almacenamiento se añaden el hexanoato de etilo y el butanoato de hexilo. Para la

mayoría de ellos, la atmósfera ULO con un periodo adicional en frío provocó un aumento en su concentración, y, por tanto, permitiría potenciar el aroma característico de la variedad. Con relación a estos compuestos observamos que la mayoría provienen de precursores tipo alcohol (1-hexanol y 1-butanol). En general, estos alcoholes también aumentaron de concentración en el caso de los frutos almacenados en condiciones ULO+2w y ULO+4w. Estos resultados sugieren que el aumentar el nivel de oxígeno (a la salida de las condiciones ULO) permite una reactivación de la enzima lipoxigenasa en el fruto, siendo considerada esta enzima como esencial en la ruta biosintética de ésteres (Lara y col., 2006, 2007; Villatoro y col., 2008; Altisent y col., 2009). Esta enzima precisa de oxígeno para su actividad, y, además, es independiente de etileno; así, su actividad continuará a pesar de que existan bajos niveles de etileno, y, por tanto, posibilitará la síntesis de compuestos tipo alcohol. Por el contrario, la enzima alcohol *o*-aciltransferasa (AAT) sí que es dependiente de etileno (Defilippi y col., 2005). Después de la salida de los frutos de la cámara y durante la maduración posterior a 20 °C, se producirán ambos tipos de compuestos (ésteres y alcoholes), aunque estos últimos a la vez se irán disipando al utilizarse en la síntesis de ésteres.

Los compuestos volátiles característicos de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ fueron el butanoato y 2-metilbutanoato de etilo, el acetato y 2-metilbutanoato de butilo, el acetato y propanoato de 2-metilbutilo, y el acetato, propanoato y 2-metilbutanoato de hexilo. Estos compuestos son los que le confieren al fruto una intensidad aromática “a manzana”, “sabor afrutado” y “fresco” (Dimick y Hoskin, 1983). En la variedad ‘Fuji’ se observó un comportamiento similar con relación a los alcoholes precursores. Los alcoholes 1-butanol, 2-metil-1-butanol y 1-hexanol mostraron diferencias significativas en su concentración a causa de las distintas atmósferas ensayadas.

Tabla 7. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Golden Reinders’[®] (procedentes de C1) después de 19 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	8,4	10,8	13,9	18,9	28,7	29,3
Acetato de etilo	18,7	19,1	17,2	15,3	15,8	16,3
Etanol	18,2	22,3	20,5	15,4	17,1	18,3
Propanoato de t-butilo	10,6 B	14,0 AB	20,0* A	5,7	8,3	8,0
Acetato de propilo	Trazas	2,2	0,7	2,6 B	5,4 A	6,7 AB
Butanoato de metilo	nd	nd	0,6	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilpropilo	2,0	4,1	6,6	5,7	7,6	11,1
1-Propanol	0,6	1,0	1,0	2,0	3,9	3,1
Butanoato de etilo	Trazas	Trazas	Trazas	0,5	1,0*	0,8
Propanoato de propilo	nd	Trazas	nd	0,8	1,5	1,3
2-Metilbutanoato de etilo	12,6*	10,4*	18,5*	19,6*	15,4*	15,9*
Acetato de butilo	18,2 C	167,3* A	92,7* B	84,3* B	236,7* A	207,3* A
Propanoato de 2-metilpropilo	nd	nd	nd	nd	Trazas	Trazas
2-Metil-1-propanol	1,3	2,2	2,6	2,1	2,3	3,0
Acetato de 2-metilbutilo	17,6*	103,3*	81,7*	128,6* B	263,4* A	317,9* A
1-Butanol	11,9 B	34,1 A	7,9 B	13,9 B	33,0 A	31,3 A
Propanoato de butilo	4,7 B	30,0* A	13,2 B	8,0 B	19,8 A	17,1 A
2-Metilpropanoato de butilo	3,1 B	20,0 A	8,8 B	5,3 B	13,2 A	11,4 AB
Butanoato de 2-metilpropilo	0,7	Trazas	Trazas	0,7	0,8	1,1
Acetato de pentilo	3,6	8,8	6,3	13,5 B	26,1 A	26,9 A
Propanoato de 2-metilbutilo	nd	0,8	0,9	1,6	2,5	3,7
2-Metil-1-butanol	2,9	6,3	6,6	6,6	10,8	11,9
Butanoato de butilo	1,4 C	38,9 A	24,8 B	27,6 B	55,4 A	51,6 A
2-metilbutanoato de butilo	0,6	11,4	7,3	56,1* B	98,8* A	119,5* A
Hexanoato de etilo	nd	nd	nd	0,8	1,5*	1,5*
1-Pentanol	1,8	1,7	1,6	1,8	2,9	3,0
Acetato de hexilo	28,7* B	249,8* A	103,1* B	158,7* B	338,8* A	328,0* A
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	nd	0,7	Trazas	5,6	9,0	12,4
2-Heptanol	nd	4,2	2,4	6,5 B	9,2 AB	15,4 A
Hexanoato de propilo	nd	nd	nd	4,0 B	3,6 B	14,3 A
Propanoato de hexilo	0,7	15,7*	6,3	22,9* B	41,3* A	40,9* A
1-Hexanol	1,5	3,5	5,0	14,2	17,2	15,9
Hexanoato de 2-metilpropilo	1,6 B	7,0 A	3,7 B	2,4	4,8	3,7
Hexanoato de butilo	2,1 B	83,4 A	56,8 A	111,9 C	168,0 B	235,4 A
Butanoato de hexilo	4,5 B	139,5 A	99,4 A	123,7 B	182,7 AB	213,7 A
2-metilbutanoato de hexilo	2,9	53,5*	46,7*	259,8*	336,5*	402,5*
Acetato de octilo	nd	nd	nd	Trazas	0,6	1,0
2-Etil-1-hexanol	4,9	4,5	4,5	1,8	5,3	4,7
Hexanoato de pentilo	nd	4,2	4,4	10,8	16,1	17,9
Hexanoato de hexilo	5,1 B	65,6 A	85,7 A	102,5 B	140,9 AB	160,2A
Octanoato de butilo	0,8 B	6,2 AB	8,9 A	5,4 B	15,2 A	15,1A
Octanoato de hexilo	nd	6,6	3,5	3,3	5,8	4,7

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 8. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Golden Reinders’[®] (procedentes de C1) después de 30 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	17,8 B	20,9 AB	31,0 A	30,4	30,5	24,0
Acetato de etilo	29,9 B	26,8 B	42,5 A	30,4 B	55,2 A	27,7 B
Etanol	20,5	29,9	26,0	21,0 B	35,0 A	23,4 B
Propanoato de t-butilo	6,2	8,0	7,2	7,0	7,1	10,5
Acetato de propilo	1,2	3,0	1,5	6,5 B	11,6 A	8,9 AB
Butanoato de metilo	Trazas	2,1	Trazas	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilpropilo	6,5 B	16,6 A	16,0 A	15,0 B	23,2 A	20,7 A
1-Propanol	1,3	2,9	1,2	6,6 B	13,1 A	6,0 B
Butanoato de etilo	Trazas	0,7	Trazas	1,6* B	3,3* A	1,5* B
Propanoato de propilo	Trazas	2,3	1,0	2,6 B	5,9 A	3,4 B
2-Metilbutanoato de etilo	4,2*	6,3*	5,9*	5,9*	12,2*	10,5*
Acetato de butilo	32,2 B	96,8* A	57,9 AB	153,4* B	231,2* A	202,0* A
Propanoato de 2-metilpropilo	Trazas	1,2 A	0,6 B	0,9 AB	1,3 A	0,8 B
2-Metil-1-propanol	4,1 B	8,0 A	8,6 A	7,6 B	11,4 A	7,7 B
Acetato de 2-metilbutilo	40,2* B	165,3* A	88,5* AB	300,8* B	487,9* A	441,6* A
1-Butanol	19,1 AB	29,8 A	6,5 B	47,7 A	63,7 A	52,4 A
Propanoato de butilo	6,3 B	20,1 A	7,7 B	24,8 B	40,3* A	23,8 B
2-Metilpropanoato de butilo	4,2 B	13,4 A	5,1 B	16,5 B	26,9 A	15,9 B
Butanoato de 2-metilpropilo	2,6	1,5	1,5	3,1	3,1	2,7
Acetato de pentilo	11,2	14,3	9,1	42,2	45,6*	42,4
Propanoato de 2-metilbutilo	2,3 B	8,2 A	2,5 B	8,6 B	14,9 A	9,2 B
2-Metil-1-butanol	5,6 B	17,9 A	12,5 AB	30,0 B	41,5 A	24,7 B
Butanoato de butilo	14,4B	26,8 A	26,6 A	87,0	93,6	84,4
2-metilbutanoato de butilo	11,3 B	52,6* A	22,2* AB	147,7* B	183,9* A	179,9* AB
Hexanoato de etilo	nd	1,8*	2,2*	4,2*	4,5*	5,4*
1-Pentanol	1,8 B	4,0 A	1,2 B	5,0 B	7,2 A	6,7 AB
Acetato de hexilo	90,2*	165,3*	130,9*	386,2*	451,6*	400,6*
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	6,7 AB	11,6 A	4,7 B	26,4 B	33,8 A	27,9 AB
2-Heptanol	3,5	7,8	4,7	39,9	38,0	26,5
Hexanoato de propilo	4,2 B	23,3 A	5,6 B	23,2 B	32,0 A	28,8 A
Propanoato de hexilo	20,7*	36,6*	28,7*	97,2*AB	103,7* A	84,1* B
1-Hexanol	9,1 B	12,0 B	18,2 A	31,4 B	37,2 A	21,4 C
Hexanoato de 2-metilpropilo	5,9	6,1	4,9	10,5 AB	12,6 A	9,0 B
Hexanoato de butilo	72,1 B	99,0 AB	129,5 A	290,7 B	364,0 A	337,2 AB
Butanoato de hexilo	107,6 B	164,2 A	177,4 A	426,0* A	417,2* A	296,3* B
2-metilbutanoato de hexilo	113,1*	171,8*	141,1*	677,0*	793,4*	731,0*
Acetato de octilo	1,5 A	0,6 B	Trazas	0,9	1,1	1,0
2-Etil-1-hexanol	13,8 A	1,6 B	3,5 B	12,7 A	5,0 B	9,2 AB
Hexanoato de pentilo	7,9	11,7	12,3	38,0 AB	43,7 A	32,4 B
Hexanoato de hexilo	65,6 C	122,8 B	194,4 A	250,6	267,8	223,2
Octanoato de butilo	8,3 B	15,4A	7,4 B	21,0 B	23,4 AB	29,6 A
Octanoato de hexilo	3,5	2,5	3,8	2,3	3,1	3,1

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 9. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Golden Reinders’[®], (procedentes de C2) después de 19 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	8,4 B	6,8 B	17,8 A	13,3 B	23,7 A	21,4 AB
Acetato de etilo	40,4 A	28,7 B	47,9 A	13,7 B	21,5 A	20,7 AB
Etanol	20,3 B	14,0 C	29,9 A	15,0	18,9	14,8
Propanoato de t-butilo	6,4 B	7,3 B	15,4 A	5,6	9,1	8,9
Acetato de propilo	nd	nd	0,6	1,6 B	2,7 B	5,5 A
Butanoato de metilo	Trazas	Trazas	Trazas	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilpropilo	1,3	1,3	1,8	3,2 B	4,1 AB	6,2 A
1-Propanol	0,7	Trazas	1,1	1,2 B	2,4 AB	2,9 A
Butanoato de etilo	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	0,6	0,7
Propanoato de propilo	nd	nd	nd	Trazas	0,7	1,0
2-Metilbutanoato de etilo	17,1* B	25,2* A	27,3* A	31,0* A	17,5* B	22,0* B
Acetato de butilo	21,3 B	17,7 B	48,9 A	56,1 C	91,5* B	182,7* A
Propanoato de 2-metilpropilo	nd	nd	nd	nd	Trazas	Trazas
2-Metil-1-propanol	1,7	0,7	1,0	0,9	1,4	1,7
Acetato de 2-metilbutilo	13,3*	19,9*	40,3*	56,6* C	146,6* B	227,9* A
1-Butanol	14,6	9,3	9,7	25,3 A	14,9 B	29,7 A
Propanoato de butilo	5,7	1,7	6,0	nd	9,8 B	15,9 A
2-Metilpropanoato de butilo	3,8	1,2	4,0	nd	6,5 B	10,6 A
Butanoato de 2-metilpropilo	Trazas	nd	nd	0,4	0,6	0,6
Acetato de pentilo	3,2	2,6	5,0	11,7 B	14,2 B	22,6 A
Propanoato de 2-metilbutilo	Trazas	Trazas	Trazas	1,3 B	1,9 AB	2,6 A
2-Metil-1-butanol	2,0	2,1	3,7	4,9	7,9	8,6
Butanoato de butilo	2,8	3,8	8,6	19,0 B	27,2 B	44,5 A
2-metilbutanoato de butilo	1,2	1,0	2,1	25,4* C	52,5* B	80,0* A
Hexanoato de etilo	nd	Trazas	2,2*	nd	nd	nd
1-Pentanol	1,0	0,6	1,2	1,1	1,8	2,1
Acetato de hexilo	41,1* AB	31,2* B	86,8* A	122,8* C	177,6* B	309,6* A
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	nd	nd	nd	2,5 B	8,1 A	9,1 A
2-Heptanol	Trazas	0,8	1,5	3,0 B	8,2 A	12,7 A
Hexanoato de propilo	nd	nd	nd	0,9 B	4,5 B	9,1 A
Propanoato de hexilo	1,3	2,3	4,8	20,2* B	29,7* B	44,5* A
1-Hexanol	1,2	1,3	3,1	10,6 B	16,1 A	17,6 A
Hexanoato de 2-metilpropilo	2,3	1,3	2,6	3,1	3,1	4,7
Hexanoato de butilo	3,6	9,0	26,4	65,3 C	120,9 B	180,4 A
Butanoato de hexilo	14,5	25,6	59,1	115,8 B	126,7 B	200,5 A
2-metilbutanoato de hexilo	3,1	8,5*	18,0*	181,8* B	245,1* B	332,7* A
Acetato de octilo	nd	2,0 B	3,4 A	nd	Trazas	Trazas
2-Etil-1-hexanol	3,1 AB	1,5 B	4,4 A	1,9	1,6	1,0
Hexanoato de pentilo	1,5	1,0	2,5	10,4 B	14,5 AB	17,5 A
Hexanoato de hexilo	8,3	19,5	36,6	89,8 B	110,7 AB	139,4 A
Octanoato de butilo	Trazas	Trazas	5,3	4,8 B	9,7 AB	14,0 A
Octanoato de hexilo	Trazas	13,3	9,6	0,9	8,4	2,3

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 10. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) or manzanas ‘Golden Reinders’[®], (procedentes de C2) después de 30 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	22,2	16,8	25,2	29,1	24,2	22,9
Acetato de etilo	75,7 A	71,1A	23,2 B	19,7	14,8	13,2
Etanol	41,4 A	32,0B	17,1 C	15,6	14,2	11,2
Propanoato de t-butilo	4,0	4,4	7,4	9,1	9,1	5,6
Acetato de propilo	1,4	0,6	nd	3,2	3,5	3,3
Butanoato de metilo	nd	Trazas	Trazas	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilpropilo	5,3	4,4	6,3	6,4 AB	6,2 B	8,5 A
1-Propanol	1,3	0,9	1,9	3,1	4,1	3,4
Butanoato de etilo	Trazas	Trazas	Trazas	0,8	1,0	0,8
Propanoato de propilo	1,0	0,6	0,9	1,1	1,7	1,6
2-Metilbutanoato de etilo	8,0* AB	15,1* A	7,0* B	6,5*	8,4	7,6
Acetato de butilo	23,7 B	31,5 AB	54,2 A	82,8*	107,2*	106,7*
Propanoato de 2-metilpropilo	nd	nd	nd	nd	Trazas	0,6
2-Metil-1-propanol	2,7 B	2,9 B	5,2 A	3,2 B	4,3 AB	4,9 A
Acetato de 2-metilbutilo	53,2*	53,9*	63,6*	137,7* B	186,4* A	204,3* A
1-Butanol	8,6	0,7	1,7	6,6 B	4,1B	28,8 A
Propanoato de butilo	1,1	2,0	2,0	17,8	43,6*	16,8
2-Metilpropanoato de butilo	0,7	1,3	1,3	11,9 B	29,0 A	11,2 B
Butanoato de 2-metilpropilo	nd	Trazas	0,7	nd	1,0 B	1,5 A
Acetato de pentilo	5,5 B	8,9 AB	10,4 A	20,1 B	20,4 B	25,6 A
Propanoato de 2-metilbutilo	2,4	1,7	2,5	2,7 B	4,1 A	4,1 A
2-Metil-1-butanol	6,8	6,9	6,0	13,0	17,4	12,4
Butanoato de butilo	9,7 B	12,4 B	27,5 A	33,5 B	42,1 AB	50,9 A
2-metilbutanoato de butilo	18,2*	11,3	17,5*	70,3*	74,5*	79,0*
Hexanoato de etilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Pentanol	nd	1,2	nd	2,2	2,8	3,3
Acetato de hexilo	70,8* B	83,5* B	178,3* A	200,4*	245,0*	297,4*
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	4,9	3,4	4,7	12,4	16,1	14,6
2-Heptanol	1,9	2,7	2,4	11,5 B	14,8 B	23,2 A
Hexanoato de propilo	6,0 A	2,0 B	2,2 B	6,5 B	7,2 B	15,4 A
Propanoato de hexilo	16,5*	18,0*	27,5*	44,8* B	54,3* B	72,7* A
1-Hexanol	8,7	7,6	8,4	15,1 B	17,7 B	24,4 A
Hexanoato de 2-metilpropilo	4,0 B	5,6 AB	7,2 B	6,5	8,8	7,2
Hexanoato de butilo	40,7 B	59,7 B	111,8 A	172,1 B	165,6 B	256,0 A
Butanoato de hexilo	61,5 C	144,4 B	226,8 A	208,5 B	273,9* A	315,8* A
2-metilbutanoato de hexilo	73,2*	89,7*	121,7*	393,4* B	390,7* B	548,4* A
Acetato de octilo	nd	Trazas	nd	nd	0,9	0,9
2-Etil-1-hexanol	1,5 C	9,4 A	4,9 B	5,6 A	6,0 A	3,0 B
Hexanoato de pentilo	4,8	6,6	8,0	21,8 B	24,5 B	35,2 A
Hexanoato de hexilo	52,5	73,7	87,6	152,6 B	177,8 B	269,7 A
Octanoato de butilo	7,0	9,5	nd	11,2 B	14,3 B	21,1 A
Octanoato de hexilo	8,7	1,1	nd	1,3	2,1	3,1

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 11. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ (procedentes de C1) después de 19 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	20,0	25,6	25,1	18,0	12,9	14,5
Acetato de etilo	36,5 C	54,4 A	43,6 B	47,3 A	20,9 B	22,8 B
Etol	24,6 B	34,3 A	31,4 A	28,5 A	17,5 B	20,0 B
Propanoato de <i>t</i> -butilo	7,5 B	9,9 AB	11,5 A	7,3	6,8	6,5
Acetato de propilo	8,8	6,1	4,7	29,8	28,7	33,8
Butanoato de metilo	Trazas	Trazas	2,3	nd	Trazas	0,6
Acetato de 2-metilpropilo	6,9 B	7,0 B	11,7 A	13,2 B	16,0 A	17,3 A
1-Propanol	9,6 A	5,1 B	5,0 B	25,0 C	38,6 A	33,6 B
Butanoato de etilo	2,4* A	1,3* B	1,2* B	6,2* C	9,6* A	8,4* B
Propanoato de propilo	8,2 A	4,0 B	6,7 AB	30,9 B	32,4 B	36,4 A
2-Metilbutanoato de etilo	22,2* B	22,6* B	32,5* A	25,7* B	56,4* A	62,4* A
Acetato de butilo	118,0*	110,0*	127,0*	93,8* B	91,5* B	140,4* A
Propanoato de 2-metilpropilo	1,1	1,1	1,4	1,5	1,7	2,2
2-Metil-1-propanol	3,3	2,3	3,5	6,1 B	7,1 A	8,1 A
2-Pentanol	1,5 AB	0,8 B	2,1 A	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilbutilo	765,9* B	763,7* B	1177,8* A	671,5*	820,5*	885,1*
1-Butanol	75,9 A	52,1 B	59,3 B	70,6	73,4	76,2
Propanoato de butilo	20,4	13,3	14,1	16,7	21,1	22,0
2-Metilpropanoato de butilo	13,6	8,9	9,4	11,1	14,1	14,7
Butanoato de 2-metilpropilo	1,0	1,1	1,5	1,3	1,3	1,8
Acetato de pentilo	24,4 B	26,2 AB	30,4 A	26,9	29,6	31,4
Propanoato de 2-metilbutilo	20,8* B	13,8 C	35,1* A	30,9* B	26,8* B	37,9* A
2-metilpropanoato de 2-metilbutilo	1,3 C	2,0 B	2,4 A	nd	nd	nd
2-Metil-1-butanol	60,5	44,9	76,9	31,2	63,5	77,7
Butanoato de butilo	29,0	31,7	32,7	18,4 C	29,3 B	36,7 A
2-metilbutanoato de butilo	36,6*	41,3*	49,0*	55,0* C	80,6* B	137,6* A
Hexanoato de etilo	nd	nd	nd	Trazas	Trazas	10,0
Propanoato de pentilo	4,1	3,1	4,1	2,8	3,2	4,3
1-Pentanol	2,1	2,2	2,7	0,9 B	1,4 AB	1,9 A
Acetato de hexilo	309,9*	289,1*	280,8*	133,1* B	196,6* A	200,7* A
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	18,2 B	24,2 B	40,5 A	35,1 B	47,8 A	54,1 A
2-Heptanol	8,0	7,7	7,5	21,0 B	25,0 B	49,1 A
Hexanoato de propilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propanoato de hexilo	103,6* A	60,2* C	75,1* B	44,3* B	60,4* A	57,5* A
1-Hexanol	11,0 B	13,3 AB	14,5 A	4,0 B	4,2 B	8,7 A
Hexanoato de 2-metilpropilo	11,1 A	7,8 B	6,7 B	4,5	5,2	5,6
Hexanoato de butilo	67,7 B	81,2 A	93,8 A	52,6 C	77,0 B	96,8 A
Butanoato de hexilo	123,5 A	126,1 A	112,5 A	46,1 B	66,9 AB	73,6 A
2-metilbutanoato de hexilo	250,7* B	285,6* A	352,5* A	207,5* B	228,3* B	315,9* A
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	Trazas	1,6	2,0
Acetato de octilo	Trazas	2,2 B	4,1 A	nd	0,6 A	nd
2-Etil-1-hexanol	3,6 B	8,1 A	6,5 A	0,9 B	1,3 AB	3,2 A
Hexanoato de pentilo	10,8 B	11,9 B	15,5 A	4,7 B	9,5 A	9,6 A
Hexanoato de hexilo	97,4	108,6	109,6	21,8	28,6	33,8
Octanoato de butilo	22,0	25,2	26,1	0,7 B	1,9 B	10,7 A
Octanoato de hexilo	3,9	4,8	4,9	Trazas	Trazas	Trazas

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0,05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 12. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Fuji Kiku® 8’ (procedentes de C1) después de 30 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	14,6 B	16,8 AB	22,3 A	14,8 B	13,4 B	24,1 A
Acetato de etilo	16,9	14,0	17,0	28,0 B	20,9 C	38,4 A
Etanol	11,5	13,8	13,1	16,5 B	17,6 AB	21,9 A
Propanoato de <i>t</i> -butilo	6,8	5,5	7,9	3,8	3,8	3,7
Acetato de propilo	8,2	6,2	5,4	21,0 B	21,2 B	31,4 A
Butanoato de metilo	0,6 B	0,6 B	4,7 A	1,1	0,6	0,7
Acetato de 2-metilpropilo	12,4	12,3	14,0	15,8 B	15,2 B	21,8 A
1-Propanol	12,7 A	7,6 B	6,2 B	27,0 C	32,7 B	42,8 A
Butanoato de etilo	3,2* A	1,9* B	1,5* B	6,8* C	8,2* B	10,7* A
Propanoato de propilo	19,3 A	7,1 B	7,0 B	22,1* B	30,5* A	30,3* A
2-Metilbutanoato de etilo	9,9*	7,5	9,3*	21,5 B	16,3 B	30,6 A
Acetato de butilo	117,1*AB	93,6* B	134,4* A	88,6* B	86,0* B	179,5* A
Propanoato de 2-metilpropilo	3,6	3,6	2,8	2,7	2,7	3,5
2-Metil-1-propanol	8,8 A	7,7 A	6,8 B	13,5	12,2	11,8
2-Pentanol	0,7	nd	nd	nd	nd	nd
Acetato de 2-metilbutilo	1223,6*B	1153,9*B	1448,4*A	660,2* B	653,6* B	1058,9* A
1-Butanol	194,2 A	116,5 B	123,8 B	54,8 B	67,9 B	98,8 A
Propanoato de butilo	3,9 B	18,2 A	20,3 A	27,0* C	34,7* B	79,3* A
2-Metilpropanoato de butilo	2,6 B	12,1 A	13,5 A	18,0 B	23,1 B	52,9 A
Butanoato de 2-metilpropilo	2,5 A	1,9 AB	1,8 B	2,0 A	2,0 A	2,3 A
Acetato de pentilo	25,2	22,2	27,4	26,7 B	27,9 B	36,9 A
Propanoato de 2-metilbutilo	66,0* A	44,4* B	44,1* B	34,5* A	36,5* A	38,7* A
2-metilpropanoato de 2-metilbutilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Metil-1-butanol	276,1 A	122,5 B	131,3 B	126,7 A	107,1 A	117,9 A
Butanoato de butilo	42,8 A	29,5 C	36,5 B	49,5 A	28,9 B	50,1 A
2-metilbutanoato de butilo	48,2*	49,9*	55,0*	90,9* B	86,0* B	173,3* A
Hexanoato de etilo	nd	nd	nd	nd	5,0* B	6,7* A
Propanoato de pentilo	7,3 A	4,4 B	3,9 B	4,3	4,6	4,2
1-Pentanol	5,0 A	4,1 B	4,2 B	3,8 A	3,5 AB	2,8 B
Acetato de hexilo	311,6* A	194,5* C	259,5* B	138,5* B	142,8* B	215,3* A
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	42,3	46,5	45,4	49,3 B	49,7 B	70,3 A
2-Heptanol	2,2 A	3,0 A	5,8 A	Trazas	Trazas	Trazas
Hexanoato de propilo	14,3	14,6	14,2	36,3 B	37,5 AB	40,5 A
Propanoato de hexilo	150,3* A	80,0* B	80,8* B	65,1* A	53,0* B	61,3* AB
1-Hexanol	10,9 A	7,0 B	13,4 A	5,6 B	6,2 B	10,3 A
Hexanoato de 2-metilpropilo	34,7 A	16,5 B	15,8 B	13,1 A	11,3 AB	9,4 B
Hexanoato de butilo	119,9 A	91,1 B	112,7 A	98,2 AB	89,1 B	114,3 A
Butanoato de hexilo	188,8 A	114,1 B	131,6 B	104,1 A	83,1 A	107,4 A
2-metilbutanoato de hexilo	444,4*A	343,2* B	429,2* B	310,5* B	285,1* B	429,7* A
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	1,3 A	0,6 B	1,3 A
Acetato de octilo	0,9	nd	nd	nd	0,6 A	0,8 A
2-Etil-1-hexanol	1,0 B	5,1 A	7,0 A	3,1 B	5,4 A	5,6 A
Hexanoato de pentilo	22,2 A	18,6 B	22,7 A	13,0	14,4	13,7
Hexanoato de hexilo	111,8 B	95,0 C	125,5 A	26,7 B	38,0 A	40,9 A
Octanoato de butilo	28,0 AB	25,6 B	33,2 A	0,6 B	8,6 A	11,4 A
Octanoato de hexilo	2,2 B	2,5 B	6,4 A	nd	0,5 A	2,0 A

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 13. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ (procedentes de C2) después de 19 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	5,7 B	11,1 A	10,4 A	9,1	9,0	11,0
Acetato de etilo	15,8 A	9,9 B	7,8 B	16,9 B	20,3 AB	20,8 A
Etanol	10,0 B	12,9 B	38,2 A	17,0	16,9	18,5
Propanoato de <i>t</i> -butilo	2,5 B	6,1 A	7,5 A	1,6	2,2	2,6
Acetato de propilo	8,7 B	18,1 A	11,6 AB	21,3 B	32,7 A	32,8 A
Butanoato de metilo	nd	nd	0,5 A	nd	Trazas	0,7
Acetato de 2-metilpropilo	7,8 B	14,1 A	14,9 A	12,9 B	14,2 B	17,3 A
1-Propanol	7,4	11,4	9,2	22,1 B	28,1 A	31,6 A
Butanoato de etilo	1,9*	2,8*	2,3*	5,5* B	7,0* A	7,9* A
Propanoato de propilo	9,6 B	18,4 A	12,6 AB	24,6 B	40,7 A	41,9 A
2-Metilbutanoato de etilo	35,7* B	46,4* B	134,6* A	36,9* B	40,3* B	76,1* A
Acetato de butilo	129,6* C	231,6* A	181,3* B	79,7* B	129,0* A	128,0* A
Propanoato de 2-metilpropilo	1,3	1,8	1,8	2,2	2,1	2,2
2-Metil-1-propanol	4,3	5,6	5,6	7,9 A	6,3 B	7,4 AB
2-Pentanol	0,8	nd	Trazas	nd	Trazas	Trazas
Acetato de 2-metilbutilo	925,6* B	1625,4*A	1531,0*A	787,6* B	809,9*AB	1034,1* A
1-Butanol	129,6 B	210,8 A	186,4 A	28,2	41,4	49,1
Propanoato de butilo	5,9 C	10,4 B	11,9 A	1,4 C	1,9 B	3,3 A
2-Metilpropanoato de butilo	4,0 C	6,9 B	7,8 A	0,9 C	1,2 B	2,2 A
Butanoato de 2-metilpropilo	1,0	1,4	1,3	1,1	1,1	1,5
Acetato de pentilo	28,1 B	45,5 A	38,6 A	23,2	28,7	30,8
Propanoato de 2-metilbutilo	26,9* B	39,4* A	40,1* A	34,2*	32,7*	37,4*
2-metilpropanoato de 2-metilbutilo	nd	nd	nd	0,8 A	nd	nd
2-Metil-1-butanol	86,4	105,6	100,5	96,1	70,9	62,1
Butanoato de butilo	32,7	34,5	35,8	17,6	22,9	24,9
2-metilbutanoato de butilo	42,5* B	66,4* A	66,5* A	56,1* B	82,1* A	83,4* A
Hexanoato de etilo	nd	nd	nd	nd	nd	8,7* A
Propanoato de pentilo	5,0	6,3	5,9	3,8	4,0	4,7
1-Pentanol	2,5 B	5,4 A	5,1 A	3,0	2,9	2,4
Acetato de hexilo	294,2* B	355,5* A	278,2* B	130,7*	139,4*	145,4*
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	17,8	26,2	33,7	35,8	29,8	35,7
2-Heptanol	3,7	2,4	2,5	33,1	34,6	38,7
Hexanoato de propilo	4,6 C	6,4 B	12,1 A	nd	nd	nd
Propanoato de hexilo	86,7*	99,8*	95,4*	38,8*	41,9*	44,9*
1-Hexanol	6,1 B	7,0 AB	8,4 A	6,6 A	5,1 AB	3,9 B
Hexanoato de 2-metilpropilo	10,4 B	14,1 A	11,1 B	6,1	6,3	5,9
Hexanoato de butilo	36,8 B	43,5 AB	52,6 A	41,4	42,0	38,9
Butanoato de hexilo	77,1 A	48,4 B	47,4 B	27,1	30,1	23,8
2-metilbutanoato de hexilo	222,0*	247,9*	261,2*	194,3*	168,8*	165,8*
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	0,8 B	1,1 AB	1,4 A
Acetato de octilo	0,9 A	nd	nd	nd	nd	1,0 A
2-Etil-1-hexanol	2,7	2,6	2,1	2,1 B	4,8 A	3,8 AB
Hexanoato de pentilo	9,0 B	7,9 B	12,8 A	8,9	6,4	8,2
Hexanoato de hexilo	41,8 B	33,2 C	58,2 A	30,6	29,2	24,2
Octanoato de butilo	3,9 B	3,4 B	6,2 A	1,4 B	2,0 B	3,4 A
Octanoato de hexilo	2,7	1,9	2,3	nd	Trazas	1,3 A

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 14. Compuestos volátiles emitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ (procedentes de C2) después de 30 semanas de almacenamiento en condiciones ULO, ULO + 2semanas en frío y ULO +4 semanas en frío más 1 y 7 días de vida comercial (20 °C).

Compuestos volátiles	d1			d7		
	ULO	ULO+2s	ULO+4s	ULO	ULO+2s	ULO+4s
Acetato de metilo	8,5 B	8,3 B	16,4 A	6,8 B	13,4 A	13,6 A
Acetato de etilo	19,9 A	11,1 B	21,4 A	7,7 C	100,3 A	19,4 B
Etanol	10,6	14,8	15,0	6,7 C	44,5 A	17,6 B
Propanoato de <i>t</i> -butilo	4,9 B	4,3 B	8,0 A	2,6 B	4,2 AB	6,4 A
Acetato de propilo	6,1	5,5	5,9	6,9 C	23,1 B	34,0 A
Butanoato de metilo	0,6	Trazas	Trazas	nd	Trazas	1,1
Acetato de 2-metilpropilo	10,5	11,4	11,5	9,3 C	12,6 B	16,3 A
1-Propanol	8,5	6,0	7,4	6,9 C	21,3 B	26,1 A
Butanoato de etilo	2,1*	1,5*	1,8*	1,7* C	5,3* B	6,5* A
Propanoato de propilo	7,1	6,8	7,2	6,5 Cb	15,9 B	25,6 A
2-Metilbutanoato de etilo	14,8*	15,0*	15,9*	28,8*	33,0*	37,1*
Acetato de butilo	54,2 B	66,0* AB	91,3* A	20,7 B	69,2* A	85,5* A
Propanoato de 2-metilpropilo	2,3	2,0	2,2	1,6 B	1,8 B	4,4 A
2-Metil-1-propanol	8,2 A	6,6 B	6,62 B	6,1 B	9,5 A	9,4 A
2-Pentanol	0,7 A	nd	nd	Trazas	Trazas	Trazas
Acetato de 2-metilbutilo	1077,4*	870,4*	1026,0*	449,6* B	1042,3* A	1216,8* A
1-Butanol	94,0 B	96,4 B	132,0 A	18,9 B	23,6 AB	49,5 A
Propanoato de butilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Metilpropanoato de butilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butanoato de 2-metilpropilo	1,7	1,4	1,5	0,8 B	1,3 B	3,6 A
Acetato de pentilo	15,4	17,4	18,7	11,6 B	26,4 A	34,8 A
Propanoato de 2-metilbutilo	50,8* A	33,9* B	42,8* AB	25,2*	29,0*	27,9*
2-metilpropanoato de 2-metilbutilo	2,2	1,7	2,3	0,7 B	1,0 AB	1,4 A
2-Metil-1-butanol	211,1 A	124,7 B	125,2 B	99,8 B	129,1 B	204,1 A
Butanoato de butilo	16,4 B	16,4 B	25,6 A	5,6 B	23,0 A	24,9 A
2-metilbutanoato de butilo	29,1*	34,9*	42,7*	15,2 B	82,8* A	74,4* A
Hexanoato de etilo	nd	0,1 B	5,0* A	nd	3,2* B	7,8* A
Propanoato de pentilo	3,2	2,9	4,0	2,0 B	2,9 B	5,7 A
1-Pentanol	5,4 A	5,3 A	4,2B	3,3	3,9	3,3
Acetato de hexilo	171,2* A	127,9* B	178,5* A	36,9* B	116,2* A	113,9* A
2-Metilbutanoato de 2-metilbutilo	36,7	31,8	34,1	15,9 C	36,0 B	85,2 A
2-Heptanol	7,7	12,8	8,5	8,9 C	31,8 A	31,5 A
Hexanoato de propilo	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propanoato de hexilo	65,4* A	45,8* B	73,7* A	12,4* B	17,8* B	40,8* A
1-Hexanol	4,4	3,9	4,0	2,5 B	5,2 A	5,9 A
Hexanoato de 2-metilpropilo	20,2 A	12,7 B	18,2 A	6,9	8,5	8,0
Hexanoato de butilo	31,3	36,7	37,0	14,2 C	30,5 B	54,1 A
Butanoato de hexilo	60,5 A	35,6 B	65,1 A	14,0 B	23,8 B	47,5 A
2-metilbutanoato de hexilo	249,8* AB	207,1* B	281,1* A	83, 8* C	183,7* B	269,6* A
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	nd	0,9B	1,8 A
Acetato de octilo	Trazas	1,3	2,4	Trazas	3,1	3,9
2-Etil-1-hexanol	3,8	3,5	2,7	2,2	2,4	3,5
Hexanoato de pentilo	8,4	9,1	8,4	3,4 B	4,8 B	8,3 A
Hexanoato de hexilo	33,5 C	37,4 B	43,6 A	15,3 B	14,3 B	24,1 A
Octanoato de butilo	2,6	3,1	3,3	0,8 B	1,3 AB	2,3 A
Octanoato de hexilo	Trazas	0,9	0,9	nd	nd	0,6 A

Los valores medios para cada compuesto volátil y día de permanencia a 20°C seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test). nd :no detectado; *: logaritmo positivo de la unidad de olor. Trazas $\leq 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Diferencias en aceptación y atributos sensoriales a causa de la fecha de cosecha

En las Tablas 15 y 16 se muestran los resultados de aceptación y puntuación de una serie de atributos sensoriales para manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Golden Reinders[®]’, respectivamente, recolectadas en dos fechas y sometidas a la atmósfera ULO para poder así comparar el efecto de las dos cosechas. En la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ (Tabla 15) no se observaron diferencias entre los frutos de ambas cosechas, para los atributos de acidez, dulzor y firmeza. En cambio, la aceptación, la jugosidad y el sabor, si bien no presentaban diferencias después de 19 semanas, después de 30 semanas los frutos procedentes de C1 tenían mayores puntuaciones de estos atributos que los de C2. En el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’ (Tabla 16), no existieron diferencias significativas de aceptación a causa de la fecha de cosecha de los frutos; la acidez y la firmeza obtuvieron puntuaciones superiores en los frutos procedentes de C1 y el dulzor y el sabor fueron superiores en frutos de C2, después de largos periodos de almacenamiento.

Adicionalmente, se evaluaron las diferencias de atributos sensoriales (mediante un panel entrenado) entre los frutos almacenados en las distintas atmósferas después de ambos periodos de almacenamiento y para cada estado de madurez (Figuras 3-4 y 5-6). Se observa que no existieron diferencias a causa de las distintas atmósferas para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ (Figuras 3 y 4), a excepción de aquellos frutos procedentes de C2 y almacenados durante 30 semanas en atmósfera ULO+4s (en los que hubo un aumento significativo de la harinosidad). En la variedad ‘Golden Reinders[®]’ (Figuras 5 y 6), en los frutos procedentes de C1 y al cabo de 19 semanas de conservación se reflejaban diferencias en la acidez, siendo la atmósfera ULO+4s la que mayor efecto negativo tuvo sobre la valoración de dicho atributo. Por otro lado, al cabo de 30 semanas de conservación se producía una disminución en los atributos de firmeza y crocancia y un aumento en la harinosidad para aquellos frutos conservados en ULO+4s. Hubo pocas diferencias en el caso de frutos procedentes de C2 y almacenados en las distintas atmósferas.

Tabla 15. Aceptación y atributos sensoriales (medidos mediante un panel de consumidores) en manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ recolectadas en dos fechas y almacenadas 19 y 30 semanas en ULO más 7 días a 20 °C.

	Cosecha 1		Cosecha 2	
	19 s	30 s	19 s	30 s
Aceptación	6.88 A	7.03 a	6.88 A	6.33 b
Acidez	-0.04 A	0.00 a	0.03 A	0.00 a
Dulzor	-0.07 A	0.09 a	0.08 A	-0.09 a
Jugosidad	0.08 A	0.20 a	-0.09 A	-0.20 b
Sabor	0.05 A	0.20 a	-0.07 A	-0.20 b
Firmeza	-0.01 A	0.08 a	0.00 A	-0.08 a

Los valores medios para cada periodo de almacenamiento seguidos de distintas letras mayúsculas almacenamiento denotan diferencias tras 19 semanas de conservación y seguidos de distintas letras minúsculas marcan diferencias significativas tras 30 semanas, en ambas y para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Tabla 16. Aceptación y atributos sensoriales (medidos mediante un panel de consumidores) en manzanas ‘Golden Reinders[®]’ recolectadas en dos fechas y almacenadas 19 y 30 semanas en ULO más 7 días a 20 °C.

	Cosecha 1		Cosecha 2	
	19 s	30 s	19 s	30 s
Aceptación	6.75 A	6.25 a	7.03 A	6.48 a
Acidez	0.32 A	0.39 a	-0.32 B	-0.39 b
Dulzor	-0.11 A	-0.31 b	0.11 A	0.31 a
Jugosidad	-0.09 A	0.13 a	0.09 A	-0.13 b
Sabor	0.14 A	-0.15 b	-0.14 B	0.15 a
Firmeza	0.16 A	0.24 a	-0.16 B	-0.24 b

Los valores medios para cada periodo de almacenamiento seguidos de distintas letras mayúsculas almacenamiento denotan diferencias tras 19 semanas de conservación y seguidos de distintas letras minúsculas marcan diferencias significativas tras 30 semanas, en ambas y para $P \leq 0.05$ (LSD test).

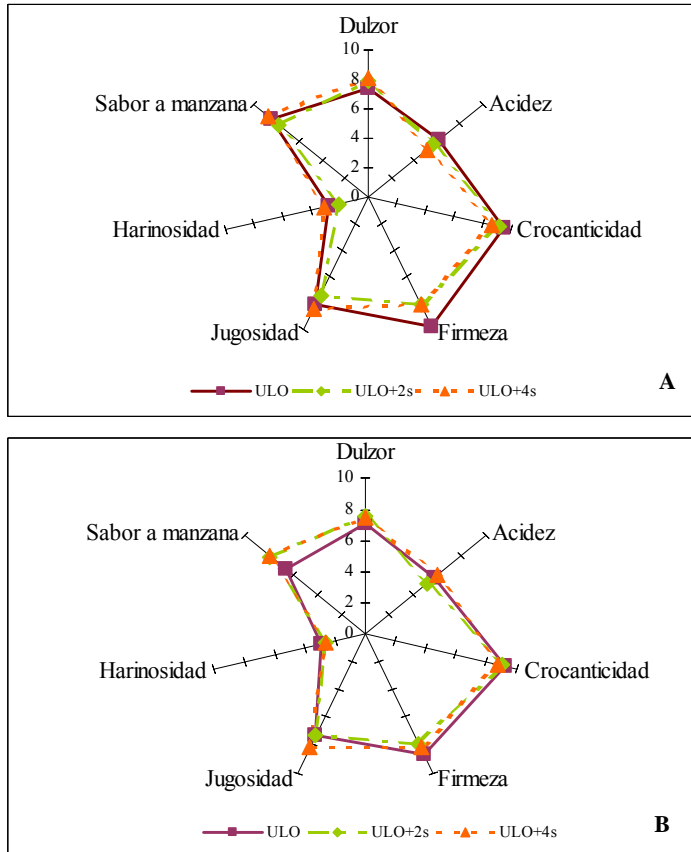


Figura 3. Atributos sensoriales (medidos mediante un panel entrenado) en manzanas ‘Fuji Kiku® 8’ recolectadas en la fecha C1 y almacenadas durante 19 (A) y 30 (B) semanas en condiciones ULO, ULO+2s y ULO+4s. *: Los valores medios para cada atributo seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test).

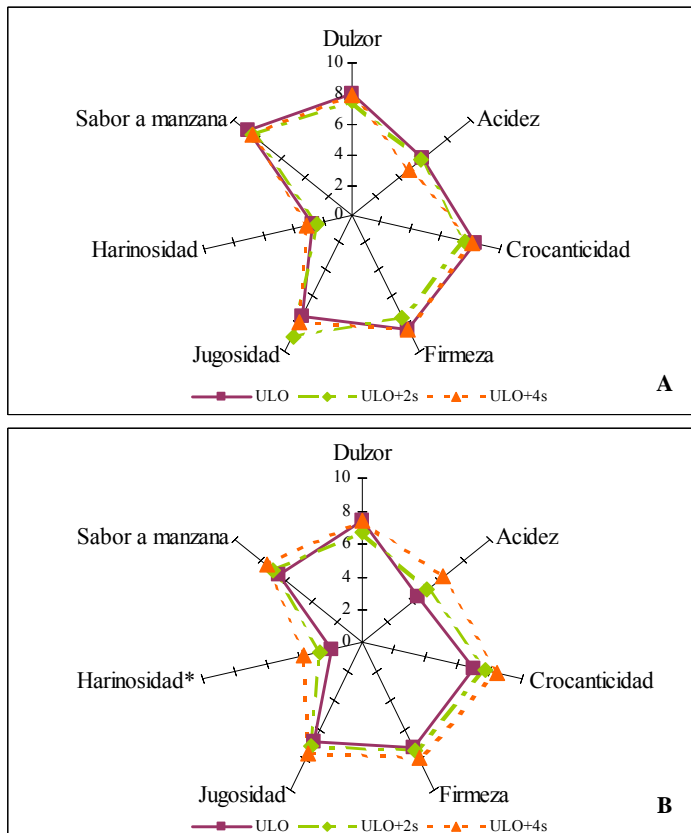


Figura 4. Atributos sensoriales (medidos mediante un panel entrenado) en manzanas ‘Fuji Kiku® 8’ recolectadas en la fecha C2 y almacenadas durante 19 (A) y 30 (B) semanas en condiciones ULO, ULO+2s y ULO+4s. *: Los valores medios para cada atributo seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test).

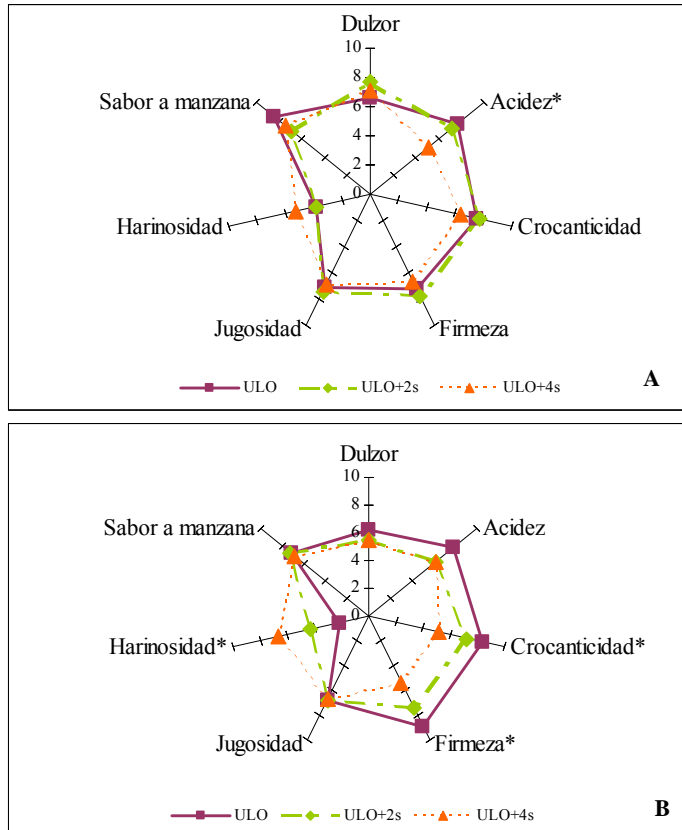


Figura 5. Atributos sensoriales (medidos mediante un panel entrenado) en manzanas ‘Golden Reinders[®]’, recolectadas en la fecha C1 y almacenadas durante 19 (A) y 30 (B) semanas en condiciones ULO, ULO+2s y ULO+4s. *: Los valores medios para cada atributo seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test).

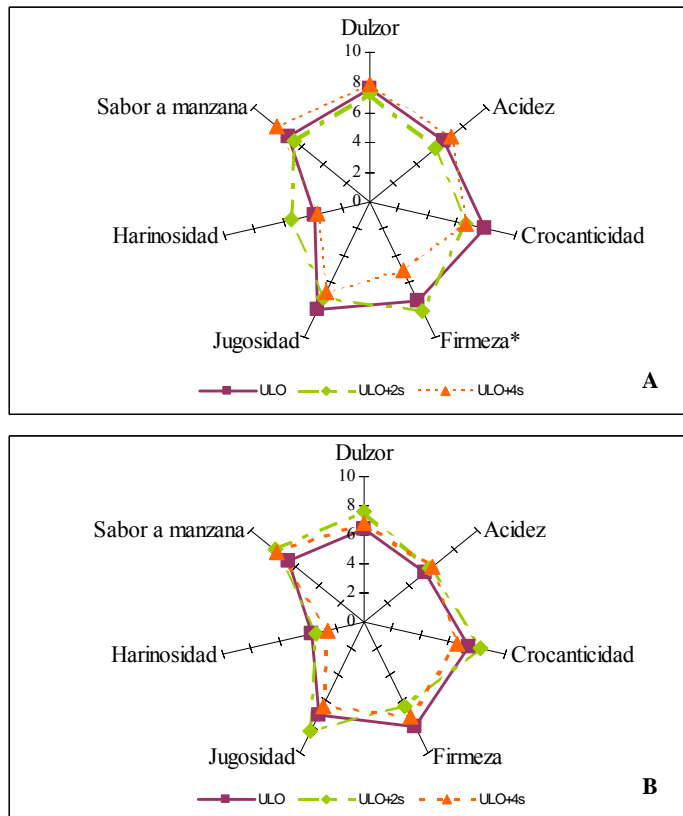


Figura 6. Atributos sensoriales (medidos mediante un panel entrenado) en manzanas ‘Golden Reinders’[®], recolectadas en la fecha C2 y almacenadas durante 19 (A) y 30 (B) semanas en condiciones ULO, ULO+2s y ULO+4s. *: Los valores medios para cada atributo seguidos de distintas letras mayúsculas son diferentes significativamente con $P \leq 0.05$ (LSD test).

4. Bibliografía

- Alegre, S.; Casals, M.** 2006. Criteris de collita per poma Gala i Golden: l’opinió del consumidor. XI Jornada Frutícola.
- Altisent, R.; Graell, J.; Lara, I.; López, L.; Echeverría, G.** 2008. Regeneration of volatile compounds in ‘Fuji’ apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8490-8497.
- Altisent, R.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, L.; Lara, I.** 2009. Lipoyxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of ‘Fuji’ apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4305-4312.
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K.; Schuch, W.** 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35, 1013-1021.

- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavour Ingredients*, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL.
- Buttery, R. G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavour of tomato and other vegetables and fruits. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*; Acree, T. E.; Teranishi, R.; Eds.; ACS Professional: Washington; pp. 261.
- DeEll, J. R.; Khanizadeh, S.; Saad, F.; Ferree, D. C.** 2001. Factors affecting apple fruit firmness—a review. *Journal of the American Pomological Society*, 55, 8-27.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C.** 1983. Review of apple flavor—state of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 387-409.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Eccher-Zerbini, P. E.; Pianezzola, A.; Grassi, M.** 1996. Preservation of the quality and nutritional value of fruit and vegetables by CA storage. *Acta Horticulturae*, 379, 321-328.
- Eccher-Zerbini, P. E.; Pianezzola, A.; Grassi, M.** 1999. Poststorage sensory profiles of fruit of five apple cultivars harvested at different maturity stages. *Journal of Food Quality*, 22, 1-17.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004a. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of ‘Fuji’ apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004b. Aroma volatile compounds of ‘Fuji’ apples in relation to harvest date and cold storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G.; Lara, I.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004c. Assessment of Relationships between sensory and instrumental quality of controlled-atmosphere-stored ‘Fuji’ apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2004d. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.
- Fazzalari, F. A.** 1978. *Compilation of Odor and Taste Threshold Data*. ASTM Data series DS 48.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Bostick, B.; Mattheis, J. P.; Patterson, M.** 1993. Ester biosynthesis in ‘Rome’ apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 3, 201-214.

- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Ferrandino, A.; Duverney, C.; Di Stefano, R.** 2001. Quality and aroma of Golden Delicious apples as influenced by the harvest date and the storage period. *Acta Horticulturae*, 553, 225-227.
- Ferrandino, A.; Duverney, C.; Di Stefano, R.** 2007. The evolution of apple volatiles during storage as influenced by fruit maturity. *Italian Journal of Food Science*, 19, 375-389.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Hansen, K.; Poll, L.; Olsen, C.; Lewis, M.** 1992. The influence of oxygen concentration in storage atmospheres on the post-storage volatile ester production of 'Jonagold apples'. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 25, 457-461.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 2000. Response of controlled atmosphere (CA) stored 'Golden Delicious' apples to the treatments with alcohols and aldehydes as aroma precursors. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 154-161.
- Harker, F. R.; Maindonald, J.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Hallett, I. C.; Walker, S. B.** 2002a. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Harker, F. R.; Marsh, K. B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002b. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: Sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Harker, F. R.; Kupferman, E. M.; Marin, A. B.; Gunson, F. A.; Triggs, C. M.** 2008. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 70-78.
- Herregods, M.; Goffings, Y.** 1994. The storage of 'Jonagold' apples in ULO – Circumstances. *Acta Horticulturae*, 343, 148-154.
- Hoehn, E.; Gasser, F.; Guggenbühl, B.; Künsch, U.** 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 27-37.
- Kupferman, E.** 2003. Controlled atmosphere storage of apples and pears. *Acta Horticulturae*, 600, 729-735.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.

- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M.L.** 2007. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6087-6095.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998a. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 194-199.
- Mattheis, J. P.; Fellman, J. K.** 1999. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 227-232.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- 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.
- Moya-León, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C.; Pereira, M.; Moggia, C.** 2007. Development of aroma compounds and sensory quality of 'Royal Gala' apples during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 403-413.
- Plotto, A.; Azarenko, A. N.; Mattheis, J. P.; McDaniel, M. R.** 1995. 'Gala', 'Braeburn', and 'Fuji' apples: Maturity Indices and Quality After Storage. *Fruit Varieties Journal*, 49, 133-142.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 1999. Characterization of 'Gala' apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Rizzolo, A.; Grassi, M.; Eccher Zerbini, P.** 2006. Influence of harvest date on ripening and volatile compounds in the scab-resistant apple cultivar 'Golden Orange'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81, 681-690.

- Rowan, D. D.; Lane, H. P.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B.** 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3276-3285.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W.** 1998. Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Hrsg: Garching, Germany.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schnabel, K. O.; Belitz, H. D.; Von Ranson, C.** 1988. Investigations on the structure-activity relationships of odorous substances. Part 1. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen function. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 187, 215-223.
- Song, J.; Bangerth, F.** 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 259-269.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 471-477.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ling, L.** 1996. Odour thresholds of various branched and straight chain acetates. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 677-680.
- Van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. H.** 1977. Compilation of Odour Threshold Values in Air and Water. National Institute for Water Supply: Voorburg, The Netherlands.
- Villatoro, C.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2008a. Long-term storage of Pink Lady apples modifies volatile-involved enzyme activities: consequences on production of volatile esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9166-9174.

CAPÍTULO 5

Short-term storage under air after ultra low oxygen storage modifies volatile substances released by ‘Golden Reinders[®]’ apples over two seasons: effects on sensory quality.

Rosa Altisent, Jordi Graell, Isabel Lara, Luisa López y Gemma Echeverría
Enviado a: *Postharvest Biology and Technology*

Abstract

The organoleptic quality of apples depends on a number of factors including firmness, texture, sweetness, sourness, aroma and flavour. Volatile compounds released by apples make a major contribution to fruit aroma and ultra low oxygen storage causes a decline in the emission of volatile compounds in several apple varieties. The aim of this work was to evaluate the influence of a period of storage under air after ultra low oxygen storage and both its potential to increase volatile compound emissions and its effect on standard and sensory quality of ‘Golden Reinders[®]’. In two seasons, apples were harvested at commercial maturity stage and stored for 19 or 30 weeks at 1 °C and 92 % relative humidity under an ultra low oxygen atmosphere (1% O₂:1% CO₂) or under an ultra low oxygen atmosphere followed by different periods (2 or 4 weeks) in cold air. Standard quality parameters were not negatively affected by these storage conditions. The results showed that 26 volatile compounds were increased by the storage conditions adding a period under cold air. Even some of these compounds are considered characteristic volatile compounds for the variety, no significant differences were observed in flavour analysed by a trained panel. In addition, the trained panel noticed a modification in acidity and texture for fruit stored under ULO+4w although no differences were observed in acceptability by consumers.

Keywords: acceptability, aroma regeneration, standard quality, sensory attributes, volatile compounds, ULO storage

1. Introduction

Low oxygen conditions are considered beneficial for apple storage, as fruits tend to maintain epidermis colour and flesh firmness longer than when stored in air. These attributes define apple quality for storage and marketing potential, but consumers also demand fruits that have an acceptable flavour and aroma. Long term storage under ultra low oxygen (ULO) conditions reduces volatile production, resulting in poor flavour and aroma compared to fruits of different apple varieties stored in air (Yahia et al., 1990; López et al., 2000; Dixon and Hewett, 2001; Rudell et al., 2002; Argenta et al., 2004; Young et al., 2004; Echeverría et al., 2004, 2008; Villatoro et al., 2009). In the absence of oxygen, esterification reactions stop and concentrations of free alcohol increase. On returning to aerobic conditions, these alcohols are metabolised either to esters (Yamashita et al., 1976) or to shorter-chain compounds before esterification (Rowan et al., 1997) or they evaporate from the tissue (Dixon and Hewett, 2001). After the removal of fruits from hypoxic conditions, there may therefore be increases in the concentrations of a wide range of esters related with apple aroma (Brackmann et al., 1993; Lavilla et al., 1999; Fellman et al., 2003; Hansen et al., 1992; Plotto et al., 2000).

Apple flavour is a complex combination of taste and odour sensations. Some of the compounds emanating from apples have been shown to have a decisive impact on sensory quality and are therefore designated as ‘impact compounds’ (Cunningham et al., 1996). The most common impact compounds found in ‘Golden Delicious’ apples include: butyl acetate, hexyl acetate, 2-methylbutyl acetate and ethyl 2-methylbutanoate (Kakiuchi et al., 1986). Different techniques have been tested to enhance the aroma of apples after storage under ULO atmosphere. Results from our group relating to ‘Fuji’ apples showed that extra periods of two and four weeks under air storage after ULO storage resulted in an increase in some volatile compounds and specifically in the ones that are most characteristic for this variety (Altisent et al., 2008). From a commercial point of view, these findings would prompt us to recommend the apple industry to remove fruits from ULO storage and to submit them to a short period under normal air before they are sold.

The present study conducted with ‘Golden Reinders[®]’ apples evaluates the effect of a period of storage under air after ULO storage on volatile compounds. The study was conducted over two years in order to show that the results were not influenced by

variations in climatic conditions from one year to another. We also analyzed the standard and sensory qualities affected by these atmospheres.

2. Materials and methods

Plant material and storage conditions

‘Golden Reinders[®]’ apples were harvested in 2006 (FS; first season) and 2007 (SS; second season) at commercial maturity: 147 and 139 days after full bloom (dafb), from 6 and 7 year-old trees, respectively. The trees were grown on M-9 EMLA rootstock at the IRTA-Experimental Station, Lleida (NE Spain). Immediately after harvest, 3 lots of 100 kg of apples per season were selected for uniformity and the absence of defects and stored at 1 °C and 92 % relative humidity in an ultra low oxygen (ULO) atmosphere (1% O₂:1% CO₂). One lot remained under ULO conditions for the whole 19 or 30 week (ULO) period. A second lot was kept for either 17 or 28 weeks under ULO conditions and then stored for 2 weeks under cold air (ULO+2w) conditions. The third lot was kept for either 15 or 26 weeks under ULO conditions followed by a further 4 weeks under cold air (ULO+4w) conditions. Volatile compound emission, quality parameters and consumer acceptability were measured at harvest and after removal from storage plus 7 days at 20 °C.

Quality parameter analyses

Fifteen fruits per treatment (season × storage conditions × storage period) were individually assessed for flesh firmness, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), starch index and skin colour. Flesh firmness, SSC, TA and skin colour were analyzed both at harvest and after removal from cold-storage, while the starch index was only measured at harvest. Flesh firmness was measured with an Effegi penetrometer (FT 327; Effegi, Alfonsine, Italy) fitted with an 11 mm plunger on two opposite surfaces at the equatorial zone of the apples; results were expressed in newtons (N). SSC and TA were measured in juice pressed from the whole fruit. SSC was determined with a hand-refractometer (Atago, Tokyo, Japan) and the results were expressed as °Brix. To determine TA, 10 mL of pulp juice was diluted with 10mL of water and titrated with a NaOH 0.1 N solution up to pH 8.2 using phenolphthaleine, and the results were expressed as g malic acid L⁻¹. Fruit colour was determined with a portable tri-stimulus colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta Corp, Osaka, Japan) using CIE illuminant D₆₅ and an 8 mm diameter measuring aperture. Skin colour was

measured at the equator of each fruit on the shaded side and hue parameter ($\text{arc tg } b^*/a^*$) was used as to measure colour of the fruits. Starch index was determined by dipping cross-sectional fruit halves in an iodide solution (15 g KI + 6 g I₂ per litre) for 30 s; starch hydrolysis was rated using a 1-10 scale (1= full, 10= no starch).

Reagents

The chemicals obtained were of the highest quality available and, unless otherwise indicated, were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ethyl acetate, *t*-butyl propanoate, propyl acetate, 1-propanol, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, pentyl acetate, 2-methyl-1-butanol, hexyl acetate, 1-hexanol, hexyl 2-methylbutanoate and 2-ethyl-1-hexanol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was purchased from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain). 2-methylpropyl acetate was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain).

Analysis of volatile compounds

Eight kilograms of apples (2 kg/replicate × 4) per treatment (season × storage conditions × storage period) were selected for volatile compound analysis both at harvest and after removal from storage. Intact fruits were placed in an 8-L Pyrex container through which an air stream (900 mL min⁻¹) was passed for 4 h. The resulting effluent was then passed through an adsorption tube (ORBO-32™; SUPELCO, Bellefonte, PA) filled with 100 mg of activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL of diethyl ether. Identification and quantification of the volatile compounds was performed on a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector (GC-FID), using a cross-linked free fatty acid as the stationary phase (FFAP; 50 m × 0.2 mm i.d. × 0.33 μm) into which a volume of 1 μL of the extract was injected in all analyses. The oven programme was set at 70 °C (1 min) and the temperature was first raised by 3 °C min⁻¹ to 142 °C and later by 5 °C min⁻¹ to 225 °C. It was then kept at this second temperature for a further 10 min. Helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ (42 cm s⁻¹), with a split ratio of 40:1. The injector and detector temperatures were held at 220 °C and 240 °C, respectively. Compounds were identified by comparing their respective retention indexes with those of standards and by enriching the apple extract with authentic

samples. Quantification was carried out by adding 25 μL of a 0.2 % solution of butylbenzene (assay >99.5 %, Fluka) as an internal standard. A GC-MS system was used for compound confirmation, using the same capillary column as in the GC analyses. Analysis was carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a 5973N mass selective detector. Mass spectrometric data were collected in full scan. Scan ranged from 30-500 amu. The scan rate was 3.1 scans s⁻¹. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (42 cm s⁻¹), following the same temperature gradient programme as previously described. Spectrometric data were recorded (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) and compared with those from the NIST HP59943C original library mass spectra. Results were expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Sensory assessment

Fruit samples removed from each atmosphere and corresponding to each storage period were stored at 20 °C for 7 days. Fifteen apples per treatment (season \times storage conditions \times storage period) were used for sensory analysis. For consumer evaluation and prior to evaluation, on each fruit to be used for the consumer test and after flesh firmness were measured, two longitudinal wedges were instrumentally analyzed as explained in the ‘Quality parameter analyses’ section; the rest of the fruit was divided in pieces and used for consumer evaluation. Three fruit samples (one per atmosphere) were placed on white plates and immediately presented to a tasting panel of 50 consumers for sensory evaluation; evaluations were obtained for both storage periods. The tasting panel was the same for all the treatments assessed. The fruit tasters were volunteers from staff working at the UdL-IRTA research institute and students from the University of Lleida. All participants were regular apple consumers. Each piece was identified by a random three-digit code. The order of presentation of the three pieces of fruit, which were presented on white plates, was randomised for each taster. Mineral water was used as a palate cleanser between tastings. All evaluations were conducted in individual booths under white illumination and at room temperature. Each taster assessed all three samples and was asked to indicate his/her degree of liking/disliking using a 9-point hedonic scale (1-dislike extremely to 9-like extremely). The samples could be re-tasted as often as desired.

Three apples per treatment were used for sensory evaluations with a trained panel. The intensities of the following attributes were evaluated by the panel: sweetness,

sourness, crispness, firmness, juiciness, mealiness and apple flavour. The intensity of each attribute was recorded on 150-mm unstructured line scales, anchored at 0 = absent and 150 = extreme, with the exception of firmness, which was anchored at 10 = low and 140 = high. The attributes were defined according to the definitions given in Harker et al. (2002a, b). During testing, cubes of outer cortical flesh (approximately 3.4 cm³; 1.5 × 1.5 × 1.5 cm) were presented to the panelists. Nine panellists (trained according to ISO 1993, no. 8586-1) scored the sensory attributes of samples. Sensory assessment took place at the Sensory Laboratory of the Food Technology Department (UdL). The sensory booth environment was at ambient temperature. Mineral water and crackers were provided as palate cleansers. Data were collected on paper ballots. All the panel members assessed all the samples. The allocation of fruit for assessment by each panel member was conducted according to a complete balanced block design. Peeled fruit samples were presented to panel members in white plastic cups. Varieties were coded using three-digit, randomly generated numbers.

Statistical analyses

A multi-factorial design was used to statistically analyze the results. The factors considered were season, storage period and storage atmosphere. All data were tested by analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) using the SAS program package (SAS, 1988). Means were separated by the LSD test at $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

Quality parameters at harvest and after cold storage

Table 1 shows the quality parameters at harvest for both seasons. Starch index, firmness value and hue were similar, whereas significant differences were observed in the SSC and TA. Fruits from the SS (2007/2008) were sweeter and sourer than fruits from the FS (2006/2007). According to previous literature, starch index is the best indicator of maturity in ‘Golden Delicious’ apples (Alegre and Casals, 2006). Then, fruits at harvest presented similar maturity stage (Table 1).

Table 1. Quality parameters of ‘Golden Reinders’[®] apples at harvest for first season (FS) and second season (SS).

	FS	SS
Starch index (1-10)	4.5 A	4.6 A
Firmness (N)	73.1 A	72.7 A
Soluble Solids Content (° Brix)	13.3 B	14.1 A
Titrateable acidity (g L ⁻¹)	5.4 B	6.0 A
Skin colour	108.3 A	110.7 A

Means followed by different capital letters for each quality parameter are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Standard quality parameters were generally well preserved after 19 and 30 weeks of storage in both seasons, however some specific particularities were observed. Figure 1 shows values for SSC, TA, firmness and colour (hue) through the storage period for both seasons and under the different storage conditions. In the case SSC, no differences were observed among storage conditions. Furthermore, storage period and season did not seem to affect this parameter. Overall, the values observed remained higher than the 12%, value recommended to maximise consumer acceptance of ‘Golden’ apples in Europe (Alegre and Casals, 2006; Hoehn et al., 2003). Values for TA remained above the minimum of 3.2 g malic acid L⁻¹ (Hoehn et al., 2003) recommended to reach acceptable eating quality in ‘Golden’ apples.. In Figure 1, we can observe that the TA of the fruits from the FS was higher than that for the SS. With respect to differences between storage conditions, we should stress that no differences were observed for the SS, whereas for the FS, fruits kept under ULO+4w showed a significant decrease in acidity with respect to ULO stored fruits. The firmness values of ULO stored fruit during the SS were the highest observed (around 70 N) but, in general, values for the other atmospheres and storage periods remained lower and around 65 N. This value is closely related to the one recommended to satisfy the majority of consumers: 66.6 N (Alegre y Casals, 2006). It is also higher than 44 N: the value recommended by other authors (Hoehn y col., 2003). Some differences were observed between atmospheres in the SS: ULO+4w stored fruits were less firm than those stored in ULO atmospheres. In the case of skin colour, no differences were observed among the different storage conditions. In general, after long term storage (30 weeks), fruits from the FS presented a more yellowish colour possibly, as a result of a more advanced stage of maturity.

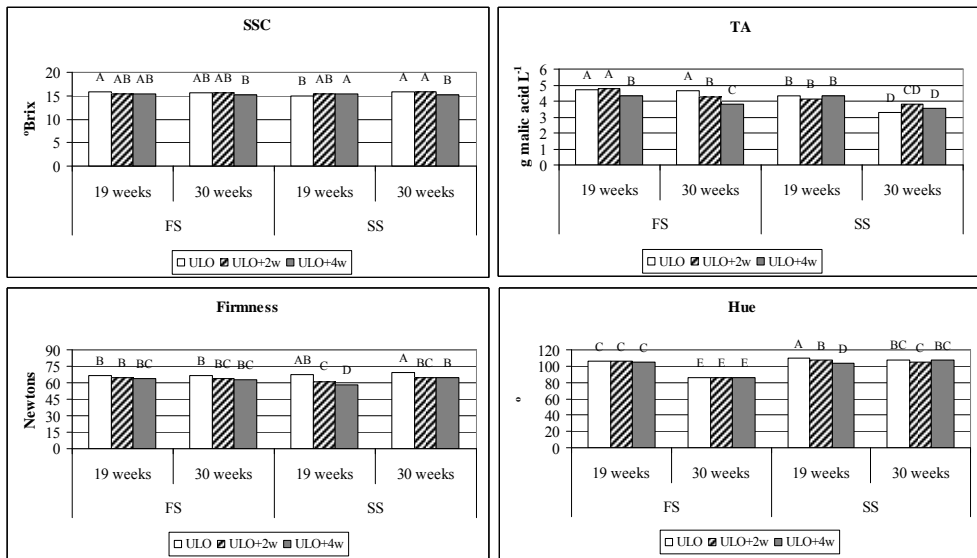


Figure 1. Standard quality parameters of ‘Golden Reinders’[®] apples after storage (19 and 30 weeks) under different storage conditions (ULO, ULO+2w and ULO+4w) plus 7 days at 20 °C in two seasons (FS, SS). Means followed by different capital letters for each quality parameter are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Volatile compound production at harvest

The volatile compound emission at harvest, retention index and odour threshold for each individual compound are presented in Table 2. The aroma profile were similar for both seasons but analysis of variance showed higher concentrations of some volatile compounds in the second season (Table 2). In the case of total volatile emissions, SS presented higher concentration than FS (FS=256.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$; SS= 797.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LSD= 107.1). Quantitatively speaking, the most important esters were ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate, which contributed 40 % of total aroma in both seasons. In addition, for fruit from the SS the esters butyl 2-methylbutanoate, butyl hexanoate and hexyl hexanoate were also important contributors to aroma profile. Alcohol-related emissions: ethanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 1-pentanol remained at the same level in both seasons. On the contrary, levels of 1-propanol, 1-butanol and 2-ethyl-1-hexanol were higher in the SS.

Table 2. Volatile compounds ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Golden Reinders®’ apples at harvest for two consecutive seasons (FS, SS). Positive log odour units in brackets.

Volatile compounds	RI ^a	OTH ^b	FS	SS
Methyl acetate	854	8300 (a)	6.0 B	13.5 A
Ethyl acetate	882	13500(b)	27.4 A	29.2 A
Ethanol	912	62450 (c)	14.6 A	34.0 A
Propyl acetate	945	2000 (d)	5.4 A	12.4 A
Methyl butanoate	955	76 (e)	1.6 A	4.0 A
2-Methylpropyl acetate	976	65 (f)	0.8	Traces
1-Propanol	992	9000 (g)	1.1 B	7.7 A
Ethyl butanoate	1002	1 (c)	Traces	0.8 A
Propyl propanoate	1008	57 (g)	nd	Traces
Ethyl 2-methylbutanoate	1015	0.006 (f)	42.1 B(3.8)	125.8 A(4.3)
Butyl acetate	1040	66 (d)	3.6 A	3.7 A
2-Methyl-1-propanol	1054	250 (h)	1.8 A	1.9 A
2-Methylbutyl acetate	1096	11 (f)	12.8 A(0.1)	14.0 A(0.1)
1-Butanol	1119	500 (g)	1.6 B	16.8 A
Butyl propanoate	1123	25 (g)	1.1 A	0.8 A
Butyl 2-methylpropanoate	1129	80 (e)	0.5	nd
2-Methylpropyl butanoate	1140	-	5.5 A	6.2 A
Pentyl acetate	1161	43 (d)	5.9 A	3.8 A
2-Methylbutyl propanoate	1180	19 (a)	0.7 B	2.8 A
2-Methyl-1-butanol	1199	250 (c)	1.4 A	1.1 A
Butyl butanoate	1218	100 (e)	2.1 A	1.5 A
Butyl 2-methylbutanoate	1235	17 (e)	1.4 B	20.2 A(0.1)
Ethyl hexanoate	1239	1 (f)	0.7 A	4.0 A(0.6)
Pentyl propanoate	1247	-	nd	Traces
1-Pentanol	1262	4000 (h)	2.0 A	1.2 A
Hexyl acetate	1292	2 (h)	30.3 A(1.2)	48.5 A(1.4)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1300	-	nd	11.8
Propyl hexanoate	1353	-	0.6 A	7.1 A
Hexyl propanoate	1379	8 (i)	3.3 B	36.8 A
1-Hexanol	1392	500 (h)	13.2 A	5.7 B
2-Methylpropyl hexanoate	1399	-	2.0	nd
Butyl hexanoate	1473	700 (e)	0.9 B	62.9 A
Hexyl butanoate	1477	250 (f)	9.8 B	86.1 A
Hexyl 2-methylbutanoate	1488	6 (e)	15.3 B(0.4)	135.4 A(1.3)
Ethyl octanoate	1499	-	5.5 A	5.4 A
2-Ethyl-1-hexanol	1565	270000 (j)	13.5 B	44.7 A
Pentyl hexanoate	1590	-	1.3 A	3.2 A
Hexyl hexanoate	1687	64000 (k)	5.8 B	38.4 A
Butyl octanoate	1690	-	2.2 A	3.3 A
Hexyl octanoate	1840	-	5.7	nd

^a Kovats retention index in cross-linked FFAP column (Poole and Poole, 1993). ^b Odour threshold ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in water reported in ref (a) (Schnabel et al., 1988), (b) (Takeoka et al., 1992), (c) (Rychlik et al., 1998), (d) (Takeoka et al., 1996), (e) (Takeoka et al., 1990), (f) (Takeoka et al., 1992), (g) (Flath et al., 1967), (h) (Buttery, 1993), (i) (Van Gemert and Nettenbreijer, 1977), (j) (Fazzalari, 1978), (k) (Burdock, 2002). Means followed by different capital letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). nd: not detected. Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$

The contribution of a given compound to aroma depends on its odour threshold (the level at which a compound can be detected by smell) and on its concentration in the fruit. Log odour unit can then be calculated from the ratio of the concentration of a

given compound to its odour threshold (Baldwin et al., 2000). Volatile compounds with positive odour units are assumed to contribute to the flavour of a food, while those with negative units may not (Buttery et al., 1990). In the present study, we determined the log odour units of volatiles present in ‘Golden Reinders[®]’ apples and those which presented positive values are shown in Table 2. The volatile compounds with positive log odour unit were ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate. Butyl 2-methylbutanoate also presented a log odour unit > 0 , but only for the second season. Other authors have also described ethyl 2-methylbutanoate and hexyl acetate as contributors to ‘Golden Delicious’ flavour at harvest (López et al., 2000).

Volatile compound production after cold storage in ULO or ULO plus AIR

Figure 2 shows significant differences in total volatile emissions between seasons. Fruits from FS presented higher concentrations of aroma compounds than fruits from the SS. After 19 weeks of storage, differences were observed between atmospheres in both seasons, with ULO+4w being the more efficient for enhancing total aroma than ULO stored fruit. After 30 weeks of storage, although the pattern was similar, with ULO+2w being the most efficient atmosphere in terms of originating a major increase in volatile compounds, significant differences were only observed during first fruit season. Other authors have detected season-to-season variations in total aroma emission of apples (López et al., 1998; Echeverría et al., 2004). These changes could be related to different climatic factors as the same pre- and post-harvest treatments were applied. Previous works demonstrated that low temperatures during the development of the fruit cause major emission of volatile compound at harvest whereas warm temperatures origin major emission upon removal from CA (Fellman y col., 1997)

As we focused our attention on the specific volatile compounds that were regenerated after the period under cold air after ULO storage, these are presented in Tables 3-6. The volatile compounds that were boosted after ULO storage were similar for the two seasons. A total of twenty-six volatile compounds were enhanced by the storage conditions with a period under cold air and fourteen out of twenty-six were straight-chain esters. According to Young et al. (2004), these results show that levels of low molecular weight esters increase more quickly after withdrawal from CA conditions

than those of high molecular weight esters. Tables 3 and 5 present volatile compound emissions after 19 weeks of storage for the first and second seasons, respectively. From these results, it should be noted that after 19 weeks of storage in the FS, their concentrations increased for both conditions (ULO+2w and ULO+4w) whereas in the SS, concentrations only increased in the case of ULO+4w stored fruit compared with ULO stored fruit. On the other hand, after 30 weeks of storage (Tables 4 and 6), the ULO+2w condition produced the most significant increase in volatile compound emissions in both seasons whereas fruit stored in ULO+4w showed a slight, but sometimes statistically significant, decline. Of the previously mentioned compounds, butyl acetate, 2-metilbutyl acetate, butyl 2-metilbutanoate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, hexyl propanoate and hexyl 2-metilbutanoate showed a positive log odour unit and are therefore considered characteristic volatile compounds for this variety. The importance of some of these esters has been highlighted by previous works (Rizzolo et al., 2006), with both ethyl- and hexyl 2-metilbutanoate and hexyl- and 2-methylbutyl acetate making important contributions to ‘Golden’ flavour.

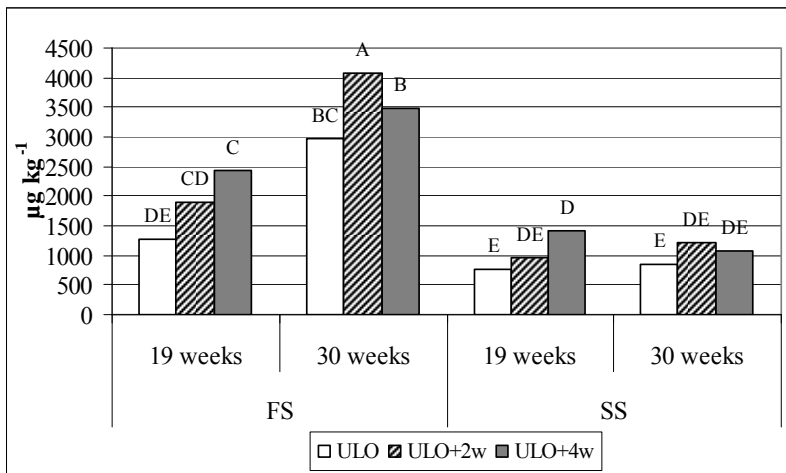


Figure 2. Volatile compound total emission from ‘Golden Reinders[®]’ apples after 19 and 30 weeks of storage plus 7 days at 20 °C in two seasons (FS, SS).. Means followed by different capital letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

A previous study on three different varieties (‘Golden Delicious’, ‘Fuji’ and ‘Braeburn’ apples) revealed that 15 compounds appeared to be the principal odorants for these varieties; they were detected by more than 75% of the assessors. Of the regenerated volatile compounds, 2-methylpropyl acetate, butyl acetate, 2-methyl-1-

propanol, 2-methylbutyl acetate, butyl propanoate and hexyl acetate from the ester group, were described as contributing fruity, sweet, apple, pear and strawberry tastes, but butyl butanoate was described as contributing the smell of rotten fruit (Mehinagic et al., 2006). Among the alcohols, 1-hexanol had a pleasant odour, which was described as fresh and with green notes, while 1-methyl-1-propanol was described as contributing a plastic odour.

Table 3. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples after storage for 19 weeks plus 7 days at 20 °C in the first season (2006/2007). Positive \log_{10} odour units in brackets.

Volatile esters	Storage atmosphere		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Propyl acetate	2.6 B	5.4 AB	6.7 A
2-Methylpropyl acetate	5.7	7.6	11.1
Butyl acetate	84.3 B (0.1)	236.7 A (0.5)	207.3 A (0.5)
2-Methylpropyl propanoate	nd	traces	traces
2-Methyl-1-propanol	2.1	2.3	3.0
2-Methylbutyl acetate	128.6 B (1.1)	263.4 A (1.4)	317.9 A (1.5)
1-Butanol	13.9 B	33.0 A	31.3 A
Butyl propanoate	8.0 B	19.8 A	17.1 A
Butyl 2-methylpropanoate	5.3 B	13.2 A	11.4 AB
Pentyl acetate	13.5 B	26.1 A	26.9 A
2-Methylbutyl propanoate	1.6	2.5	3.7
Butyl butanoate	27.6 B	55.4 A	51.6 A
Butyl 2-methylbutanoate	56.1 B (0.5)	98.8 A (0.8)	119.5 A (0.8)
Ethyl hexanoate	0.8	1.5 (0.2)	1.5 (0.2)
Hexyl acetate	158.7 B (1.9)	338.8 A (2.2)	328.0 A (2.2)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	5.6	9.0	12.4
Propyl hexanoate	4.0 B	3.6 B	14.3 A
Hexyl propanoate	22.9 B (0.5)	41.3 A (0.7)	40.9 A (0.7)
1-Hexanol	14.2	17.2	15.9
2-Methylpropyl hexanoate	2.4	4.8	3.7
Butyl hexanoate	111.9 C	168.0 B	235.4 A
Hexyl butanoate	123.7 B	182.7 AB	213.7 A
Hexyl 2-methylbutanoate	259.8 (1.6)	336.5 (1.7)	402.5 (1.8)
Pentyl hexanoate	10.8	16.1	17.9
Hexyl hexanoate	102.5 B	140.9 AB	160.2 A
Butyl octanoate	5.4 B	15.2 A	15.1 A

Means followed by different capital letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). nd: not detected. Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Previous works reported that butyl acetate, hexyl acetate, butanol, 2-methylbutyl acetate, butyl butanoate, hexyl butanoate and butyl hexanoate were the most abundant substances found and accounted for more than 80% of total volatiles produced (Song and Bangerth, 1996; Plotto et al., 1999; Young et al., 1996).

Fifteen of the twenty-six volatile esters regenerated by ‘Golden Reinders[®]’ apples were also increased by the same storage condition in ‘Fuji Kiku[®] 8’ apples (Altisent et al., 2008). This would seem to indicate that the regeneration potential of the atmospheres tested with the extra period under cold air behaved in a similar way for different varieties. It is important to emphasize that the mentioned variety, as bicoloured cultivar, has different volatile profile that ‘Golden Reinders’. Several studies have revealed that red and bicoloured apples tend to show higher total ester values than green apples (Young et al., 2004). Fellman and co-workers (1998, 2000) suggested that the intensity of peel colour, as determined by anthocyanin content, may be correlated with total ester content, at least for ‘Red Delicious’ apples.

Table 4. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples after storage for 30 weeks plus 7 days at 20 °C in the first season (2006/2007). Positive \log_{10} odour units in brackets.

Volatile esters	Storage atmosphere		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Propyl acetate	6.5 B	11.6 A	8.9 AB
2-Methylpropyl acetate	15.0 B	23.2 A	20.7 A
Butyl acetate	153.4 B (0.4)	231.2 A (0.5)	202.0 A (0.5)
2-Methylpropyl propanoate	0.9 AB	1.3 A	0.8 B
2-Methyl-1-propanol	7.6 B	11.4 A	7.7 B
2-Methylbutyl acetate	300.8 B (1.4)	487.9 A (1.6)	441.6 A (1.6)
1-Butanol	47.74	63.73	52.4
Butyl propanoate	24.8 B	40.3 A	23.8 B
Butyl 2-methylpropanoate	16.5 B	26.9 A	15.9 B
Pentyl acetate	42.2	45.6	42.4
2-Methylbutyl propanoate	8.6 B	14.9 A	9.2 B
Butyl butanoate	87.0	93.6	84.4
Butyl 2-methylbutanoate	147.7 B (0.9)	183.9 A (1.0)	179.9 AB (1.0)
Ethyl hexanoate	4.2 B (0.6)	4.5 B (0.7)	5.4 A (0.7)
Hexyl acetate	386.2 (2.3)	451.6 (2.3)	400.6 (2.3)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	26.4 B	33.8 A	27.9 AB
Propyl hexanoate	23.2 B	32.0 A	28.8 A
Hexyl propanoate	97.2 AB (1.1)	103.7 A (1.1)	84.1 B (1.0)
1-Hexanol	31.4 B	37.2 A	21.4 C
2-Methylpropyl hexanoate	10.5 AB	12.6 A	9.0 B
Butyl hexanoate	290.7 B	364.0 A	337.2 AB
Hexyl butanoate	426.0 A	417.2 A	296.3 B
Hexyl 2-methylbutanoate	677.0 (2.0)	793.4 (2.1)	731.0 (2.1)
Pentyl hexanoate	38.0 AB	43.7 A	32.4 B
Hexyl hexanoate	250.6	267.8	223.2
Butyl octanoate	21.0 B	23.4 AB	29.6 A

Means followed by different capital letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Table 5. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples after storage for 19 weeks plus 7 days at 20 °C for the second season (2007/2008). Positive \log_{10} odour units in brackets.

Volatile esters	ULO	Storage atmosphere	
		ULO+2w	ULO+4w
Propyl acetate	1.3	1.7	2.3
2-Methylpropyl acetate	5.0	4.0	7.0
Butyl acetate	39.2 B	41.2 B	68.6 A (0.1)
2-Methylpropyl propanoate	Traces	Traces	0.6 A
2-Methyl-1-propanol	0.7 B	0.6 B	1.5 A
2-Methylbutyl acetate	79.5 B (0.9)	106.4 AB (1.0)	138.9 A (1.1)
1-Butanol	4.7 B	5.8 B	10.2 A
Butyl propanoate	4.3 B	5.6 B	8.2 A
Butyl 2-methylpropanoate	nd	nd	0.6
Pentyl acetate	6.3 B	7.2 B	12.6 A
2-Methylbutyl propanoate	nd	0.6 B	10.3 A
Butyl butanoate	26.9 B	18.0 B	38.3 A
Butyl 2-methylbutanoate	23.3 B (0.1)	22.6 B (0.1)	39.5 A (0.4)
Ethyl hexanoate	nd	Traces	nd
Hexyl acetate	95.6 B (1.7)	78.7 B (1.6)	142.9 A (1.8)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	5.5	5.4	6.9
Propyl hexanoate	3.3	3.2	4.8
Hexyl propanoate	40.2 B (0.7)	32.3 B (0.6)	66.4 A (0.9)
1-Hexanol	13.0	8.4	18.8
2-Methylpropyl hexanoate	18.0 B	16.9 B	38.6 A
Butyl hexanoate	92.8 B	68.9 B	154.7 A
Hexyl butanoate	118.0 B	88.2 B	177.7 A
Hexyl 2-methylbutanoate	131.7 B (1.3)	91.8 C (1.2)	221.9 A (1.6)
Pentyl hexanoate	1.7	nd	1.4
Hexyl hexanoate	6.7 B	5.7 B	11.3 A
Butyl octanoate	58.7 B	68.1 B	117.2 A

Means followed by different capital letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Table 6. Regenerated esters and alcohols ($\mu\text{g kg}^{-1}$) emitted by ‘Golden Reinders’[®] apples after storage for 30 weeks plus 7 days at 20 °C in the second season (2007/2008). Positive \log_{10} odour units in brackets.

Volatile esters	Storage atmosphere		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Propyl acetate	2.2 B	21.3 A	1.9 B
2-Methylpropyl acetate	5.5 B	25.7 A	9.4 B
Butyl acetate	45.3 B	92.7 A (0.1)	58.1 B
2-Methylpropyl propanoate	0.6 C	1.0 B	1.3 A
2-Methyl-1-propanol	1.5 C	2.3 B	2.9 A
2-Methylbutyl acetate	111.9 (1.0)	116.3 (1.0)	106.2 (1.0)
1-Butanol	10.0	13.3	11.4
Butyl propanoate	5.9 B	9.0 A	7.8 A
Butyl 2-methylpropanoate	Traces	0.7 AB	0.8 A
Pentyl acetate	7.7 B	12.0 A	10.3 AB
2-Methylbutyl propanoate	1.3	1.0	1.9
Butyl butanoate	26.0 B	44.0 A	39.5 A
Butyl 2-methylbutanoate	27.5 B (0.2)	44.9 A (0.4)	36.0 AB (0.3)
Ethyl hexanoate	nd	25.2 A (1.4)	nd
Hexyl acetate	89.1 B (1.6)	156.4 A (1.9)	113.0 B (1.7)
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	7.0 B	21.2 A	7.3 B
Propyl hexanoate	4.4 B	22.6 A	5.8 B
Hexyl propanoate	27.8 B (0.5)	55.4 A (0.8)	35.6 B (0.6)
1-Hexanol	14.7 B	30.9 A	15.9 B
2-Methylpropyl hexanoate	0.6 B	5.1 A	2.2 AB
Butyl hexanoate	76.8 B	124.8 A	91.9 B
Hexyl butanoate	123.6 B	162.1 A	160.8 A
Hexyl 2-methylbutanoate	118.2 B (1.3)	151.0 AB (1.4)	168.2 A (1.4)
Pentyl hexanoate	0.9	2.8	nd
Hexyl hexanoate	9.4	12.9	10.4
Butyl octanoate	83.5	83.1	93.3

Means followed by different capital letters for each volatile compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). nd: not detected. Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$

Acceptability and sensory attributes after cold storage in ULO or ULO plus AIR

Results from Figure 3 show that scores relating to consumer liking degree or acceptability remained similar from one season to another and that, furthermore, no important differences were observed between the different storage conditions or for the different storage periods. The values observed remained higher than 6 on the 9-point hedonic scale, meaning that the fruit was judged quite satisfying for consumers. Previous works conducted with ‘Fuji’ apples and using the same atmospheres revealed similar results: there were no significant differences and average values ranged between 6 and 7 on the 9-point scale (Altisent et al., 2008).

In order to deepen on the differences between fruits stored under ULO, ULO+2w or ULO+4w, a trained panel assessed different attributes such as sweetness, sourness, crispness, firmness, juiciness, mealiness and flavour. For fruit from the FS, Figure 4 shows that the fruits stored under ULO+4w condition for 19 weeks presented the lowest sourness values. After 30 weeks of storage, the trained panel detected significant differences in crispness, firmness, and mealiness, even though no differences were observed in instrumental firmness. Fruit stored under ULO+4w atmosphere for 30 weeks was associated with the lowest scores for crispness and firmness and the highest for mealiness. According to other authors (Harker and Johnston, 2008), texture is an attribute that has an important influence on consumer acceptability. In fact, texture is as important as flavor in influencing consumer preferences and choices involving many fruits. Furthermore, fruit texture is among the primary attributes that determine how convenient fruits are to handle and eat. In the SS, similar results were obtained, with the attributes of sourness and texture being the most affected. Other authors have demonstrated the influence of controlled atmospheres on optimal values and the determination of highly acceptable ranges of firmness (Konopacka and Plocharski, 2004). A specific study on ‘Golden Delicious’ apples stored for 4 and 6 months revealed that decreases in total pectins and hemicelluloses and increases in free pectins were lowest under low oxygen-CA conditions, high under standard CA conditions and, the highest under normal atmosphere conditions (Siddiqui et al., 1996). Our results show that the 4-week period under cold air started with the predicted degradation.

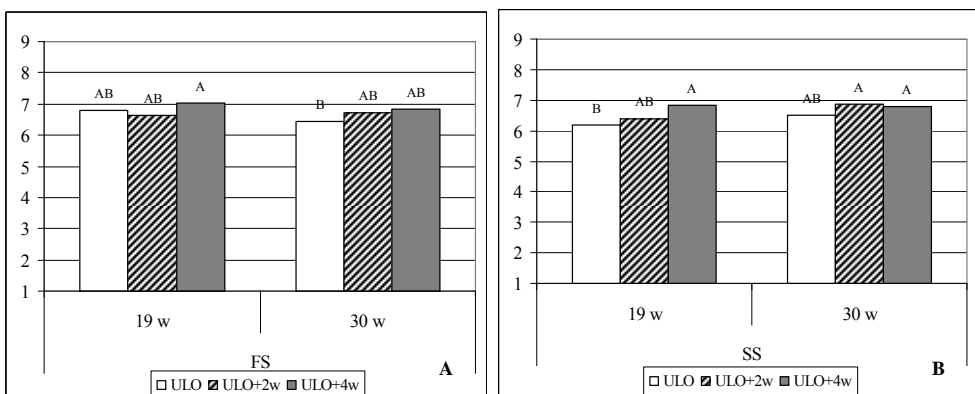


Figure 3. Acceptability scores for ‘Golden Reinders’[®] apples for two seasons (FS, 3A; SS, 3B) after 19 and 30 weeks of storage plus 7 days at 20 °C. Means followed by different capital letters for each season are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

In conclusion, this study revealed that short-term storage under ULO+4w conditions seemed to be the most efficient way to increase emissions of some volatile compounds and more specifically those that are most characteristic for the variety. In contrast, after long-term storage, fruits stored under a ULO+2w atmosphere showed maximum production and also preserved sensory attributes relating to texture. However, this increase observed in the volatile compound emission did not cause an increase in the flavour of the fruit.

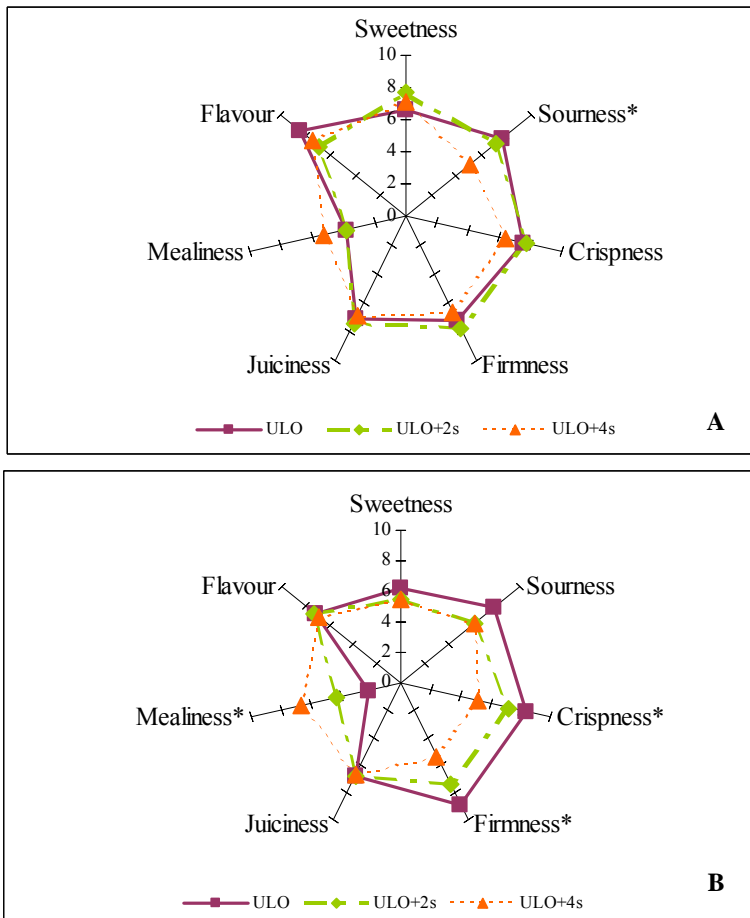


Figure 4. Sensory attributes for ‘Golden Reinders’[®] stored for 19 (A) and 30 (B) weeks under ULO, ULO+2w and ULO+4w storage conditions in the first season (2006/2007). *Means for different atmospheres for each sensory attribute are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

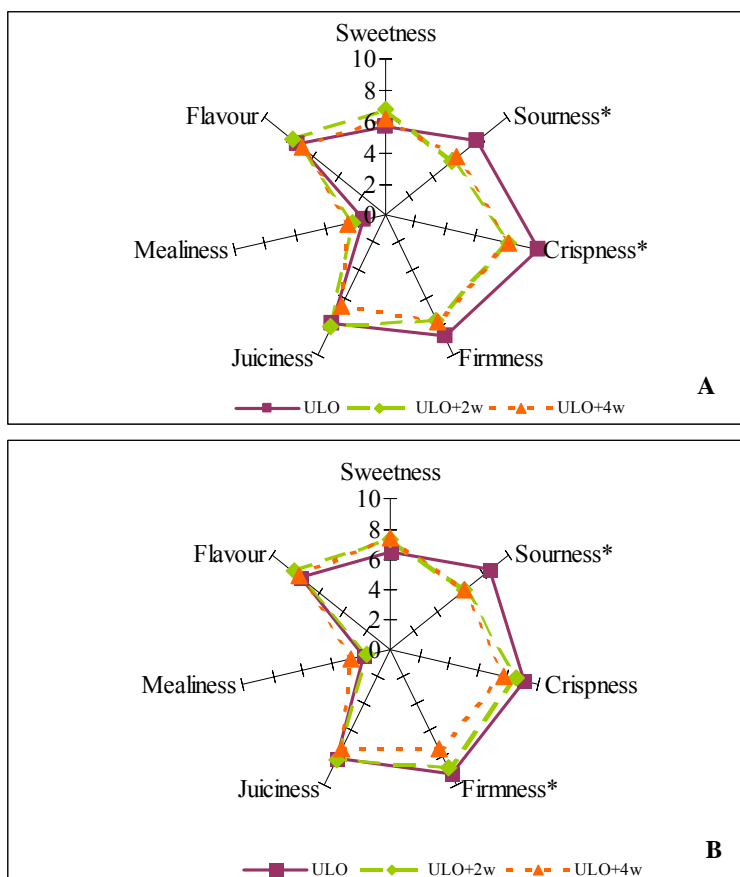


Figure 5. Sensory attributes for 'Golden Reinders[®]' apples stored for 19 (A) and 30 (B) weeks under ULO, ULO+2w and ULO+4w storage conditions in the second season (2007/2008). * Means for different atmospheres for each sensory attribute are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

4. References

- Alegre, S.; Casals, M.** 2006. Criteris de collita per poma Gala i Golden: l'opinió del consumidor. XI Jornada Frutícola.
- Altisent, R.; Graell, J.; Lara, I.; López, L.; Echeverría, G.** 2008. Regeneration of volatile compounds in 'Fuji' apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8490-8497.
- Argenta, L. C.; Mattheis, J. P.; Fan, X.; Finger, F. L.** 2004. Production of volatile compounds by Fuji apples following exposure to high CO₂ or low O₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5957-5963.

- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K.; Schuch, W.** 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35, 1013-1021.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavour Ingredients*, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL.
- Buttery R.G., Takeoka G., Teranishi R. and Ling L.C.** 1990. Tomato aroma components - identification of glycoside hydrolysis volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 2050-2053.
- Buttery, R.G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor tomato and other vegetables and fruits. In: *Flavor science: Sensible principles and techniques*, Acree, T. E., Teranishi, R., Eds.; American Chemistry Society: Washington, DC; pp 259-286.
- Cunningham, D. G.; Acree, T. E.; Barnard, J.; Butts, R. M.; Braell, P. A.** 1986. Cham analysis of apple volatiles. *Food Chemistry*, 19, 137-147.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Temperature of hypoxic treatment alters volatile composition of juice from 'Fuji' and 'Royal Gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 71-83.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Fazzalari F. A.** 1978. *Compilation of odor and taste threshold values data*. ASTM Data Series DS 48A. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, U.S.A.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Fan, X.; Mattheis, J. P.** 1997. 'Fuji' apple storage characteristics in relation to growing conditions and harvest maturity in Washington State. In *Apples and Pears. Proceedings of the 7th International CA Conference-2*; Mitcham, E. J., Ed.; pp. 235-240.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors than influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Hansen, K.; Poll, L.; Olsen, C.; Lewis, M.** 1992. The influence of oxygen concentration in storage atmospheres on the post-storage volatile ester production of 'Jonagold apples'. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 25, 457-461.

- Harker, F. R.; Maindonald, J.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Hallett, I. C.; Walker, S. B.** 2002a. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Harker, F. R.; Marsh, K. B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002b. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: Sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Harker, F. R.; Johnston, J. W.** 2008. Importance of texture in fruit and its interaction with flavour. In *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; CRC Press: Washington, DC; pp. 132-149.
- Hoehn, E.; Gasser, F.; Guggenbühl, B.; Künsch, U.** 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 27-37.
- Kakiuchi, N.; Moriguchi, S.; Fukuda, H.; Ichimura, N.; Kato, Y.; Banba, Y.** 1986. Composition of volatile compounds of apple fruits in relation to cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55, 280-289.
- Konopacka, D.; Plochanski, W. J.** 2004. Effect of storage conditions on the relationship between apple firmness and texture acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 205-211.
- Lavilla, T.; Puy, J.; López, M. L.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Relationship between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in Granny Smith apples stored in different controlled-atmosphere treatments by means of multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3791-3803.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: Golden Delicious and Granny Smith. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- 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.
- Miller, T. W.; Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.; Mattinson, D. S.** 1998. Factors that influence volatile ester biosynthesis in 'Delicious' apples. *Acta Horticulturae*, 464, 195-200.
- Plotto, A.; McDaniel, R. M.; Mattheis, J. P.** 1999. Characterization of Gala apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.

- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Poole, C. L.; Poole, S. K.** 1993. The Column in Gas Chromatography. In *Chromatography Today*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp 176-181.
- Rowan, D. D.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B.** 1997. Deuterium labelling to study aroma biosynthesis in stored apples. In *CA'97 Proceedings Volume 2: Apples and Pears*; Mitcham, E. J., Eds.; Univ California, Davis, CA; pp. 227-233.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wyllie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W.** 1998. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Hrsg. Garching.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schnabel, K. O.; Belitz, H. D.; Von Ranson, C.** 1988. Investigations on the structure-activity relationships of odorous substances. Part 1. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen function. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 187, 215-223.
- Siddiqui, S.; Brackman, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1996. Controlled atmosphere storage of apples: cell wall composition and fruit softening. *Journal for Horticultural Science*, 71, 613-620.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 471-477.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ling, L.** 1996. Odour threshold of various branched and straight chain acetates. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 29, 677-680.
- Van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. H.** 1977. *Compilation of odour threshold values in air and water*. National Institute for Water Supply, Voorburg, The Netherlands.
- Villatoro, C.; López, M. L.; Echeverría, G.; Graell, J.** 2009. Effect of controlled atmospheres and shelf life period on concentrations of volatile substances released by 'Pink Lady[®]' apples and on consumer acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1023-1034.
- Yahia, E. M.; Liu, F. W.; Acree, T. E.** 1990. Changes of some odour-active volatiles in controlled atmosphere-stored apples. *Journal of Food Quality*, 13, 185-202.

- Yamashita, I.; Nemoto, Y.; Yoshikawa, S.** 1976. Formation of volatile alcohols and esters from aldehydes in strawberries. *Phytochemistry*, 15, 1633-1637.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Young, J. C.; George Chu, C. L.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.

CAPÍTULO 6

Straight-chain esters heightened after ultra low oxygen storage and its relation to the lipoxygenase system in 'Golden Reinders' apples.

Rosa Altisent, Jordi Graell, Isabel Lara, Luisa López y Gemma Echeverría
Enviado a: *European Food Research and Technology*

Abstract

Emissions of volatile compounds and the activity of lipoxygenase system-related enzymes in ‘Golden Reinders[®]’ apples were analyzed after different atmosphere conditions (ultra low oxygen-ULO storage and ULO plus a period under cold air) involving a total of 19 and 30 weeks of storage. This study examined modifications in the capacity for volatile ester production, specifically focusing on modification in lipoxygenase and hydroperoxide lyase activity. Volatile compound emission reached a maximum after 30 weeks of cold storage plus 7 days at 20 °C. The period of storage under cold air promoted to increase the emission of esters. Straight-chain esters were closely related to lipoxygenase activity in the flesh tissue, leading, suggesting that lipoxygenase enzyme plays an important role in the emission of straight-chain esters: the most characteristic volatile type associated with this apple variety.

Keywords: ‘Golden Reinders[®]’, LOX system, straight-chain esters, regeneration, ULO storage,

1. Introduction

Today's fruits do not appear to have the same flavour that people remember from the past and this is a common topic for discussion. Despite the attention paid by purveyors of these products to their appearance, size, shape and freedom from blemishes, there is an underlying dissatisfaction with their flavour when they are consumed (Wyllie, 2008). Product quality is critical for individual preferences and hence for product acceptance, with flavour being a critical feature. Flavour, more than any other quality criteria, can be understood in more than one way. It is represented by substance content and physical properties, but also relates to consumer perceptions. Flavour seems to reflect the prototype of the modern concept of quality (Brückner, 2008). The key components of the fruit flavour complex are the volatile compounds that constitute aroma. The aroma-related properties of fruits depend upon the combination of volatiles, their respective concentrations, and the odour thresholds of individual volatile compounds. In apple, the most typical aroma compounds are the fruity esters that develop during ripening, with the maximum endogenous ester concentration occurring at the climacteric peak (Defilippi et al., 2005).

It has been suggested that reduced volatile production after controlled atmosphere (CA) storage could result from limiting the supply of immediate precursors rather than from degradation or rendering alcohol *o*-acyltransferase (AAT) and alcohol dehydrogenase (ADH) inactive (Fellman et al., 1993; Lara et al., 2006, 2007). This is in agreement with other reported results in which the treatment of fruit or tissue sections with deuterated flavour precursors (Rowan et al., 1996, 1999; Matich and Rowan, 2007) or with the vapours of aldehydes, alcohols, and carboxylic acids (Harb et al., 1994; Dixon and Hewett, 2000), significantly enhanced concentrations of the corresponding volatile esters. It has been suggested that reduced amounts of esters after lengthy low oxygen storage and subsequent ripening at ambient conditions may result from the reduced oxidation of lipids and the consequent lack of precursors for these esters (Brackmann et al., 1993; Fellman et al., 1993). Previous works on 'Fuji' apples revealed that an extra period under cold air conditions after ultra low oxygen (ULO) storage allowed an increase in the emission of some volatile compounds and, more specifically, to some of the most characteristic volatile compounds associated with the variety in question (Altisent et al., 2008).

For apple, it has also been reported that the binding of alcohol substrates is rate-limiting in comparison with that of acyl CoA substrates (Souleyre et al., 2005) and that the ultimate preference of the enzyme AAT for alcohol precursors is dependent on substrate concentration, which therefore determines the final volatile profile. Results for ‘Pink Lady[®]’ apples (Villatoro et al., 2008) suggested that other enzymes situated upstream of AAT in the metabolic pathways leading to the biosynthesis of volatile esters may control their production by either providing or limiting the supply of the necessary aldehyde and alcohol precursors. This proposition is based on several works showing that the LOX enzyme appeared to play a key role in the production of volatile esters (Lara et al., 2006, 2007; Altisent et al., 2009). Thus, the enzyme activities involved in the synthesis of precursor compounds such as lipoxygenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPL) were found to play a key role in the regulation of the precise composition of the volatile fraction emitted by the apple fruit (Villatoro et al., 2008).

Within the European Union, the most cultivated apple variety is ‘Golden’ with 24.6%, followed by ‘Gala’ (10.5%) and ‘Jonagold’ (9.1%) (World Apple Review, 2007). ‘Golden Reinders[®]’ is a mutation of ‘Golden Delicious’, discovered in the Netherlands. This variety is suitable for cultivation in areas that are less-than-optimal for cultivation. Their fruits are not very susceptible to rust, which is the most potential factor compared to ‘Golden Delicious’. The skin is very smooth and fruits have a nice shape. Their flesh is golden, firm, and crisp. It is sweet and exhibits a very low acid content. This variety is somewhat less flavourful and produces somewhat lower yields than ‘Golden Delicious’. As no relevant literature has been found for this variety, it seems important to improve our knowledge of its metabolism and to see whether it is possible to enhance its flavour.

The purpose of this work was therefore to examine modifications in the capacity of ‘Golden Reinders[®]’ apples to produce volatile esters, specifically straight-chain esters which are considered the main compounds in the ‘Golden’ group. This evaluation will be done after short and long periods of ULO storage plus different periods under normal air conditions, with special emphasis on the alterations induced by storage conditions on LOX and HPL activity. The knowledge of the influence of some enzyme activities in modifying the capacity to produce volatile esters can us to lead to an improvement of the apple flavour and consequently to a greater consumer satisfaction.

2. Materials and methods.

Plant material and storage conditions

Apple (*Malus × domestica* Borkh. cv. 'Golden Reinders[®]') fruits were harvested in 2006 at commercial maturity, 146 days after full bloom (dafb), from 6 year-old trees grown on M-9 EMLA rootstock at an experimental orchard (Estació Experimental IRTA-Mollerussa) near Lleida (NE Spain). Flesh firmness at harvest averaged 73.1 N, soluble solids content was 13.3 g 100 g FW⁻¹, and titratable acidity was 5.4 g malic acid L⁻¹. Immediately after harvest, 3 lots of 100 kg of apples were selected for their size, colour uniformity and the absence of defects, and stored at 1 °C and 92 % relative humidity (RH) in an ultra-low oxygen atmosphere (ULO; 1% O₂:1% CO₂) for up to either 19 and 30 weeks, respectively. One lot of ULO-stored fruit remained under these conditions for the whole period (19 or 30 weeks). A second lot was kept for under ULO conditions for either 17 or 28 weeks and then stored for 2 weeks in cold AIR (ULO+2w). A third batch of fruit was kept in an ULO for either 15 or 26 weeks followed by a further 4 weeks in cold AIR (ULO+4w). After storage, fruits were stored at 20 °C in order to simulate commercial shelf-life for either 1 or 7 days. Volatile compound emission, acetaldehyde content, ethylene production and enzyme activities were measured after removal from storage plus 1 and 7 days at 20 °C. Volatile compound emissions were also studied at harvest.

Chemicals

All of the standards for the volatile compounds studied in this work were of analytical grade and were purchased at the highest quality available. Ethyl acetate, *t*-butyl propanoate, propyl acetate, 1-propanol, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, pentyl acetate, 2-methyl-1-butanol, hexyl acetate, 1-hexanol, hexyl 2-methylbutanoate and 2-ethyl-1-hexanol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was purchased from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain). 2-methylpropyl acetate was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain). The rest of the compounds (up to 49 in all) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Analysis of volatile compounds

Eight kg of apples (2 kg/replicate × 4 replicates) per treatment (storage conditions × storage period × shelf-life period) were selected in order to analyze their volatile

compounds both at harvest and after removal from storage. Intact fruits were placed in an 8 L Pyrex container through which an air stream (900 mL min^{-1}) was passed for 4 h. The resulting effluent was then passed through an adsorption tube (ORBO-32™; SUPELCO, Bellefonte, PA) filled with 100 mg of activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL of diethyl ether. The identification and quantification of volatile compounds was performed on a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector (GC-FID), using a polyethylene glycol capillary column with cross-linked free fatty acid as the stationary phase (FFAP; $50 \text{ m} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.33 \text{ }\mu\text{m}$) into which a volume of $1 \text{ }\mu\text{L}$ of the extract was injected in each analysis. The oven program was set at $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) and the temperature was first raised by $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $142 \text{ }^\circ\text{C}$, later by $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $225 \text{ }^\circ\text{C}$, and then kept constant for 10 min at this last temperature. Helium was used as the carrier gas (42 cm s^{-1}), with a split ratio of 40:1. The injector and detector were held at $220 \text{ }^\circ\text{C}$ and $240 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. A second capillary column (SGE, Milton Keynes, UK) with 5% phenyl polysilphenylene-siloxane as the stationary phase (BPX5, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$) was also used for compound identification under the same operating conditions as described above. Compounds were identified by comparing their respective retention indexes with those of standards and by enriching apple extract with authentic samples. Quantification was carried out by adding $25 \text{ }\mu\text{L}$ of a 0.2 % solution of butylbenzene (assay >99.5%, Fluka) as an internal standard. A GC-MS system was used for compound confirmation, using the same capillary column as in the GC analyses. Analysis was carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to a 5973N mass selective detector. Mass spectrometric data were collected in full-scan. The scan range was from 30-500 amu. The scan rate was $3.1 \text{ scans sec}^{-1}$. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (42 cm s^{-1}), following the same temperature gradient program as previously described. Spectrometric data were recorded (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) and compared with those from the NIST HP59943C original library mass spectra. Results were expressed as $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Analysis of acetaldehyde concentration

At each sampling date, juice from 20 fruits per treatment (atmosphere \times storage period \times shelf-life period) was individually obtained. A 5 mL sample was then

introduced into a 10 mL test tube, which was subsequently closed with an elastic cap and frozen at -20 °C until analysis of its acetaldehyde content was conducted, as described by Ke et al. (1994). Frozen juice from each fruit was thawed and incubated at 65 °C for 1 h. A 1 mL headspace gas sample was taken with a syringe and injected into a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph, equipped with a column containing Carbowax (5 %) on Carbopack (60 : 80, 2 m × 2 m i.d.) as the stationary phase, and a flame ionization detector. Nitrogen was used as the carrier gas (24 cm s⁻¹), and operating conditions were as follows: oven temperature 80 °C, injector temperature 180 °C, and detector temperature 220 °C. Acetaldehyde was identified and quantified by comparison with an external standard, and the results were expressed as μL L⁻¹.

Determination of ethylene production

Ethylene production was measured after 1 and 7 days at 20 °C after cold storage, for both storage periods. Six apples per treatment (storage period × atmosphere) were weighed, placed in 3 L respiration jars, and continuously aerated with humidified air at a rate of 5 L h⁻¹. Gas samples of the effluent air from the respiration jars were taken with a 1 mL syringe and injected into a gas chromatograph (Agilent Technologies 6890N) equipped with a flame ionization detector and an alumina column (1.5 m × 3 mm). Gas analyses were conducted isothermally at 100 °C. The N₂ carrier gas, air, and H₂ flows were 45, 400, and 45 mL min⁻¹, respectively. The injector and detector were held at 120 and 180 °C, respectively. Results were expressed as μL kg⁻¹ h⁻¹ of ethylene.

Extraction and assay of volatile-related enzyme activities

Lipoxygenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPL) activity were determined 1 and 7 days after removal from storage. Samples of both skin and flesh tissue were taken separately from four different apples, frozen in liquid nitrogen, lyophilized, powdered, and kept at -80 °C until processing. 100 mg of lyophilized, powdered tissue was used for each individual assay. LOX activity was determined as described elsewhere (Lara et al., 2003). Briefly stated: the sample was homogenized in 1 mL of extraction solution (0.1 M phosphate, pH 7.5, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)). After centrifugation, 100 μL of the supernatant was diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), and LOX activity were measured as the increase in absorbance at 234 nm over time related with the formation of hydroperoxides, using linoleic acid as the substrate. For the analysis of HPL activity,

tissue was homogenized in 1mL of extraction solution (85 mM MES, pH 6.0, 5 mM DTT, 0.1 % (v/v) Triton X-100 and 1 % (w/v) PVPP). After centrifugation, 100 μ L of the supernatant was used to determine HPL activity according to the coupled assay described by Vick (1991). The reduction in NADH, in the presence of a commercial ADH and the aldehyde substrates generated by the HPL-catalyzed reaction, was measured by following the increase in absorbance at 340 nm over time. Total protein content in the enzyme extract was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using BSA as the standard. In both cases, one activity unit (U) was defined as the variation in one unit of absorbance per minute, as measured in an Ati Unicam UV 2 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Spain). Each determination was performed in triplicate and the results were expressed as specific activity (U mg protein⁻¹).

Statistical Analyses

A multi-factorial design was used to statistically analyze the results. The factors considered were: storage period, storage atmosphere and shelf-life period. All data were tested by analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) using the SAS program package (SAS, 1988). Means were separated by the LSD test at $p \leq 0.05$.

For multivariate analysis, samples were characterized according to average values for the variables assessed (volatile compounds, acetaldehyde content and enzyme activities). Partial least square regression (PLSR) was used as a predictive method to relate acetaldehyde content and ester and alcohol emissions (Y variables) to LOX and HPL activity in both flesh and skin tissue (X variables) as potentially explanatory variables. Unscrambler vers. 7.6a software (CAMO, 1997) was used to develop these models. As a pre-treatment, data were centred and weighted, using the inverse of the standard deviation of each variable in order to avoid the influence of the different scales used for the variables (Martens and Naes, 1989). Full cross-validation was run as a validation procedure.

3. Results and discussion

Volatile compound emission at harvest

Thirty-nine compounds were identified and quantified in the volatile fraction emitted by 'Golden Reinders'[®] apples at harvest which was composed of 29 esters (20

straight-chain esters and 9 branched-chain esters) and 8 alcohols (Table 1). Total aroma emission was 256 µg kg⁻¹. Esters (eight acetates, five butanoates, three propanoates, six hexanoates, three 2-methylbutanoates, three octanoates and two 2-methylpropanoate) were quantitatively the most prominent of the compounds produced, accounting for 80% of total volatiles emitted at harvest. Four of these 30 esters (ethyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate) stood out quantitatively, accounting for 45 % of total volatile production (Table 1). These results are in agreement with previous works on ‘Golden Delicious’ apples, from which ‘Golden Reinders®’ originated, which revealed that 82% of total volatile content corresponded to esters (López et al., 1999). Moreover, within the aromatic profile of ‘Golden Delicious’ apples, the predominance of ester compounds gives the characteristic ‘apple’ odour, mainly due to the ethyl propionate and butyl acetate, with a touch of sweet-fruity flavour being given by hexyl acetate (Mehinagic et al., 2006).

The contribution of a particular volatile compound to overall flavour is expressed by the odour unit. According to these odour units, the main characteristic compounds for ‘Golden Delicious’ are the butyl acetate, hexyl acetate, ethyl butanoate, hexyl acetate, ethyl hexanoate, 2-methylbutyl acetate and ethyl 2-methylbutanoate (Kakiuchi et al., 1986; López et al., 1998; Dixon et al., 2000; López et al., 2000). From our results and using the odour thresholds cited in the literature (Table 1), the aroma of ‘Golden Reinders’ apples was predominantly characterized by ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl acetate, hexyl acetate and hexyl 2-methylbutanoate. These compounds are therefore understood to have an important impact on overall flavour at harvest (Buttery, 1993). Among them, hexyl acetate and butyl acetate represented more than 60% of the total volatile emission (Brackmann et al., 1993) and are considered the main compounds for the variety (Dirinck and Schamp, 1989).

Table 1. Aroma volatile compounds emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples at harvest and positive log₁₀ odour units in brackets.

Volatile compounds ^a	RI ₁ ^b	RI ₂ ^c	OTH ^d	Amount (µg kg ⁻¹)
Methyl acetate	854	-	8300(a)	6.0
Ethyl acetate	882	609	13500 (b)	27.4
Ethanol	912	-	62450(c)	14.6
Propyl acetate	945	649	2000(d)	5.4
Methyl butanoate	955	656	76(e)	1.7
2-Methylpropyl acetate	976	691	65(f)	0.8
1-Propanol	992	-	9000(g)	1.1
Ethyl butanoate	1002	803	1(c)	traces
Ethyl 2-methylbutanoate	1015	845	0.006 (f)	42.1 (3.8)
Butyl acetate	1040	813	66(d)	3.6
2-Methyl-1-propanol	1054	996	250 (h)	1.8
2-Methylbutyl acetate	1096	876	11(f)	12.8 (0.1)
1-Butanol	1119	626	500(g)	1.6
Butyl propanoate	1123	910	25(g)	1.1
Butyl 2-methylpropanoate	1129	1009	80(e)	Traces
2-Methylpropyl butanoate	1140	954	not found	5.5
Pentyl acetate	1161	914	43(d)	5.9
2-Methylbutyl propanoate	1180	950	19(a)	0.7
2-Methyl-1-butanol	1199	667	250(c)	1.4
Butyl butanoate	1218	1000	100(e)	2.1
Butyl 2-methylbutanoate	1235	1042	17(e)	1.4
Ethyl hexanoate	1239	1002	1(f)	0.7
1-Pentanol	1262	688	4000(h)	2.0
Hexyl acetate	1292	1015	2(h)	30.3 (1.2)
Propyl hexanoate	1353	1099	not found	0.6
Hexyl propanoate	1379	1109	8(i)	3.3
1-Hexanol	1392	869	500(h)	13.3
2-Methylpropyl hexanoate	1399	1153	not found	2.1
Butyl hexanoate	1473	1196	700(e)	0.9
Hexyl butanoate	1477	1197	250(f)	9.8
Hexyl 2-methylbutanoate	1488	1239	6(e)	15.3 (0.4)
Ethyl octanoate	1499	1201	not found	5.5
2-Ethyl-1-hexanol	1565	1031	270000(j)	13.5
Pentyl hexanoate	1590	1293	not found	1.3
Hexyl hexanoate	1687	1392	64000 (k)	5.9
Butyl octanoate	1690	1394	not found	2.2
Hexyl octanoate	1840	1707	not found	5.7
TOTAL				256.0

^a Compounds identified on the basis of a comparison of mass spectrometric data and retention indices with an authentic reference compound; ^b Kovats retention index in cross-linked FFAP column. ^c Kovats retention index in cross-linked BPX5 column.; -: eluted with the solvent. ^d Odour threshold (µg kg⁻¹) in water reported in ref (a) (Schnabel et al., 1988), (b) (Takeoka et al., 1992), (c) (Rychlik et al., 1998), (d) (Takeoka et al., 1996), (e) (Takeoka et al., 1990), (f) (Takeoka et al., 1992), (g) (Flath et al., 1967), (h) (Buttery, 1993), (i) (Van Gemert et al., 1977), (j) (Fazzalari, 1978), (k) (Burdock, 2002). Traces ≤ 0.5 µg kg⁻¹

Total volatile emission and ethylene production after storage under ULO storage

The total volatile fraction emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples after short- (19 weeks) and long-term (30 weeks) cold storage is shown in Figure 1. The total volatile emission, following 1 day at 20 °C after removal from cold storage, revealed that for

short and long-term storage no differences were found between different atmospheres. The emission of the volatile compounds after 7 days at 20 °C was different depending on the storage period. Following 19 weeks of storage, the longer the period under air conditions, the higher was the emission of volatile compounds, then fruit stored under ULO+4w got the highest production. However, after long-term storage plus 7 days at 20 °C, total volatile emission got the highest values for fruit stored under ULO+2w. In this last scenario, total volatile emission increased for all atmospheres, exhibiting the highest emissions with respect to other storage and shelf-life periods. Other works in ‘Golden Delicious’ showed a maximum of the volatile compound emission after 5 months of storage (López et al., 2000), whereas other authors (Lara et al., 2007) suggested for ‘Gala’ apples that extended storage, especially under CA, should lead to an unrecoverable loss of ester-synthesizing ability during the subsequent period of fruit shelf-life. Differences with respect to ULO stored fruit were also observed in ‘Pink Lady®’ apples and were not overcome during the shelf-life period at 20 °C, thus showing a permanent residual effect of CA on the capacity of fruit to biosynthesize volatile esters (Villatoro et al., 2008). What is more, these results are not in accordance with the findings of other authors for ‘Golden Delicious’ (López et al., 1999). The results of these authors confirmed that extending the storage period from 5 to 7 months reduced the total volatile fraction, but no decrease was observed during the period from 3 to 5 months, as previously also reported by Brackmann (1989) for ‘Golden Delicious’ with CA of 3% O₂:3% CO₂, 1% O₂:1% CO₂ and normal cold storage. For other apple cultivars, such as ‘Fuji’ and ‘Mondial Gala®’, similar results have been associated - to some extent - with the inhibition of LOX activity under hypoxic conditions, which leads to a shortage of lipid-derived substrates for AAT-catalyzed esterification (Lara et al., 2006; 2007).

Ripening in air at 20°C favoured the synthesis of the majority of volatile compounds after storage, especially after 7 months of storage. Other works on ‘Golden Delicious’ apples also noted that ester production increased under all CA conditions during the shelf-life period (López et al., 1999).

Figure 2 represents the production of ethylene for both the storage period and shelf-life. From the results, it can be concluded that there were no significant differences between atmospheres for a given storage and shelf-life period. Even so, in general, the production of ethylene was higher after 7 days at 20 °C. Similarly, the

volatile compounds emission was higher after 7 days at 20 °C, then it corroborates the influence of ethylene in the biosynthesis of volatile compounds. Kondo et al. (2006) showed that the chemical inhibition of ethylene action suppresses volatile emission. Moreover, several studies have shown that the genes responsible for volatile biosynthesis are regulated by ethylene (Schaffer et al., 2007).

Previous works in ‘Gala’ apples, showed that with the exhibition during 7 days to external ethylene, an increase in the emission of volatile compounds were observed and especially of the straight-chain esters (Mattheis y col., 2005). In addition, treatment with 1-MCP (inhibitor of ethylene receptors) reduces the production of volatile esters compared to non-treated fruits (Moya-León y col., 2007; Defilippi y col., 2004; Kondo y col., 2006; Mattheis y col., 2005).

In a preliminary study involving a transgenic ‘Greensleeves’ apple with suppressed ethylene biosynthesis, the suppression of ethylene caused a major reduction in all groups of volatiles, and especially in that of esters and alcohols. Subsequent exposure to ethylene led to a recovery in the levels of alcohols and esters, with them returning to similar ones to those observed in the non-transformed line (Defilippi et al., 2005). These observations support the findings of earlier studies which reported that ethylene is a modulator of volatiles responsible for aroma production (Fan et al., 1998; Lurie et al., 2002; Defilippi et al., 2004). The same study also suggested that LOX was independent of ethylene modulation (Defilippi et al., 2005).

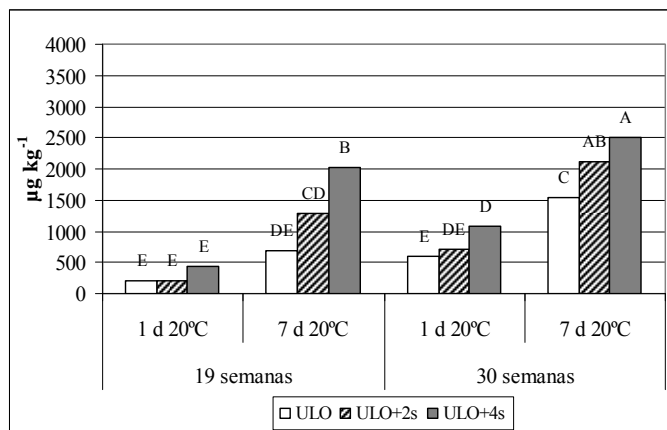


Figure 1. Total volatile compound emission ($\mu\text{g kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders’[®] apples after 19 and 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C. Means showing different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

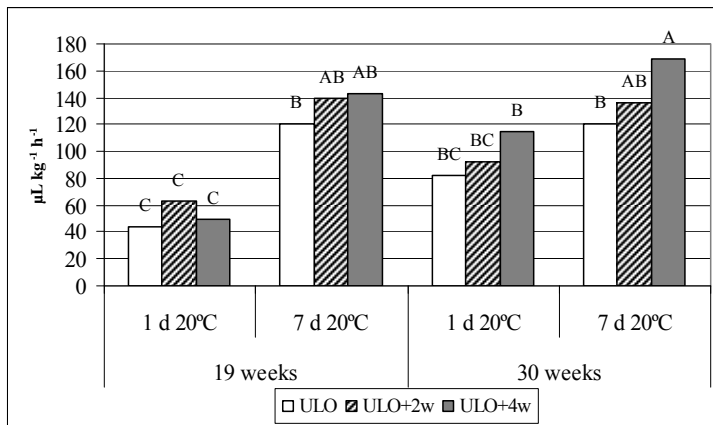


Figure 2. Ethylene production for ‘Golden Reinders’[®] apples after 19 and 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C. Means showing different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

Modifications of lipoxygenase and hydroperoxide lyase activity after ULO storage

Lipoxygenase and hydroperoxide lyase were found to be key enzymes in the regulation of the actual composition of the volatile fraction emitted by apple fruit (Villatoro et al., 2008). Lara et al. (2003) also revealed that LOX can be regarded as a key enzyme in the formation of volatiles from lipids, and may play a major role in determining the composition of volatile compounds in fruits. Moreover, the cleavage of fatty acid hydroperoxides into aldehydes by hydroperoxide lyase (HPL) is likely to be another key point in the biosynthesis of aroma compounds through the LOX system.

Figure 3 shows the activity of lipoxygenase for both flesh and skin tissues. Figure 3A revealed a similar pattern to that observed in Figure 1 for total volatile compound emission. After 1 day at 20 °C and upon removal from cold storage, no differences were observed between different atmospheres and storage periods. Furthermore, values remained lower than after 7 days at 20 °C for ULO+4w atmosphere. Partial inhibition of LOX activity upon removal from storage under hypoxic conditions is consistent with the oxygen requirement for this enzyme activity and agrees with previous reports on other apple cultivars in which it has been shown to account for a shortage of fatty acid-derived precursors and thus for a reduction in the biosynthesis of volatile esters after CA storage for ‘Fuji’ and ‘Mondial Gala’[®] apples (Lara et al., 2006, 2007). On the other hand, the greatest volatile compound emissions were produced after 30 weeks of storage

plus 7 days at 20 °C (Figure 1) and the same performance was observed for LOX activity in flesh tissue (Figure 3A). In addition, the amount of LOX activity in the flesh tissue increased threefold with respect to skin tissue. These results do not agree with previously reported results that suggested that volatile compounds in apples are primarily synthesized in the fruit peel (Rudell et al., 2002); as well, GC-MS analysis indicated that the capacity for volatile ester production was greater in the peel than in the pulp (Defilippi et al., 2005).

With respect to hydroperoxide lyase (HPL) in flesh tissue (Figure 4A), no differences were observed between different atmospheres, storage and shelf-life periods, except after long term storage plus 7 days at 20 °C, when HPL activity diminished with time spent under air conditions. In Figure 4B, an inconclusive pattern is observed; there were no significant differences between atmospheres for a given storage period and shelf-life.

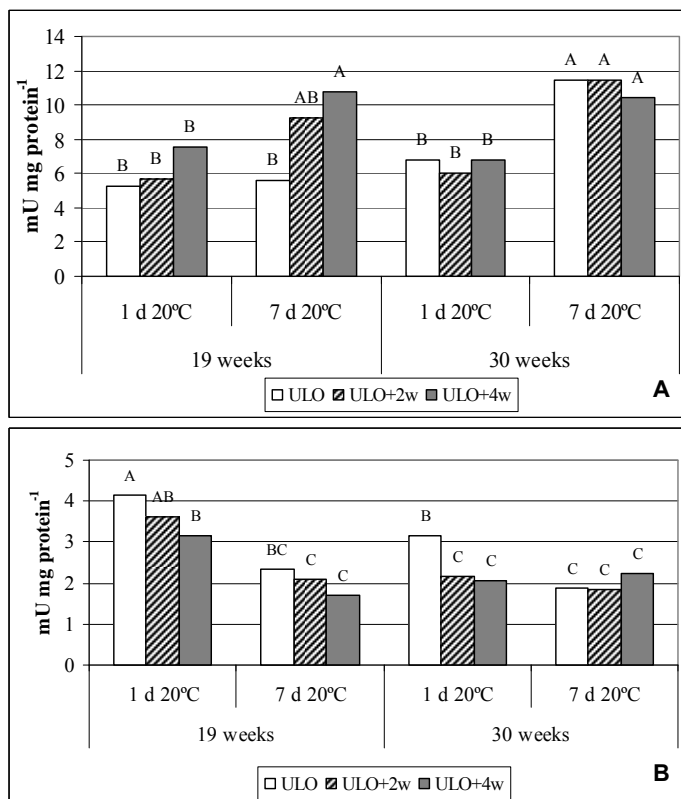


Figure 3. LOX activity in flesh (A) and skin (B) tissue for ‘Golden Reinders’[®] apples after 19 and 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C. Means showing different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

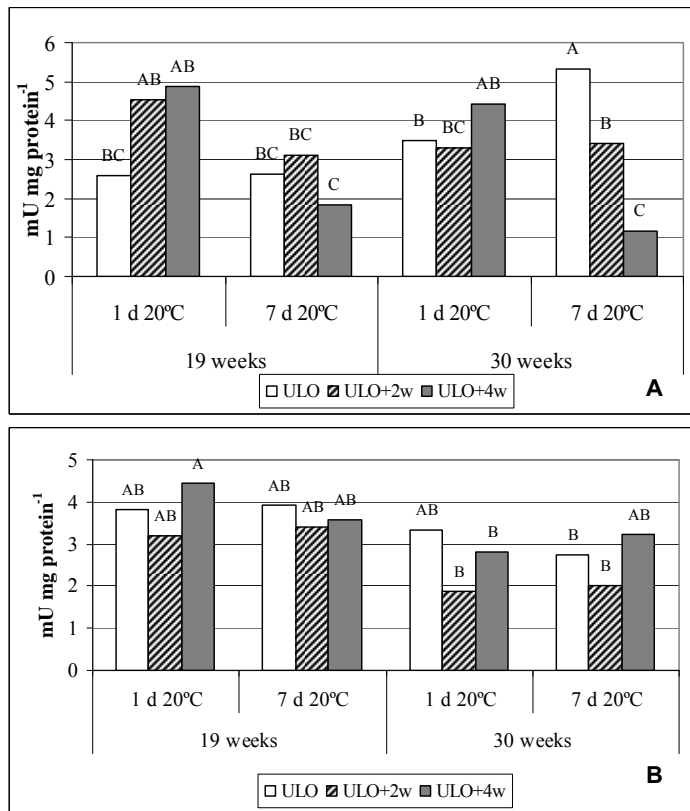


Figure 4. HPL activity in flesh (A) and skin (B) tissue for ‘Golden Reinders’[®] apples after 19 and 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C. Means showing different capital letters are significantly different at $p \leq 0.05$ (LSD test).

Modifications of straight-chain esters and alcohol emission related to enzyme activity

Figure 1 shows a clear separation between the two storage periods studied. A greater amount of volatile compound was observed after 30 weeks of storage than after 19 weeks. We therefore decided to discuss the results for the two storage periods separately.

The LOX pathway is responsible for the widest variety of aroma compounds from fatty acids. During fruit maturation, LOX pathway enzymes and substrates have different sub-cellular locations, so the emission of volatiles by this pathway would not be possible. In the course of ripening, cell walls and membranes become more permeable to different substrates, thus increasing the chance of reaction and the

possibility of the LOX pathway playing a role in fruit aroma. The esters produced by a ripening apple can be broadly separated into straight-chain and branched-chain types. Whereas straight-chain esters are thought to be derived from fatty acids via the lipoxygenase (LOX) and β -oxidation pathways, branched-chain esters are thought to arise from the metabolism of branched-chain amino acids (Sanz et al., 1997). As mentioned before, the straight chain esters are the main contributors to the aroma profile in ‘Golden Delicious’, then, the study of the LOX pathway will help us to understand and thus, try to improve the amount of these compounds achieving a better flavour of the fruits after ultra low oxygen storage.

We will also take into account the production of alcohols, as previous works on ‘Pink Lady®’ revealed that 76% of the variability in ester emissions could be attributed to precursor availability (Villatoro et al., 2008). As different authors have reported that butyl acetate and hexyl acetate are the predominant and most characteristic compounds associated with aroma in ‘Golden Delicious’ (Poll and Hansen, 1990; Olías et al., 1992; Song and Bangerth, 1994), we will make an in depth study of the evolution of these compounds throughout the storage and shelf-life periods. Tables 2-3 show the emission of this ester-type, whereas Tables 4-5 show the emission of alcohols after short and long-term storage, respectively.

Table 2 corresponds to straight-chain ester emissions by ‘Golden Reinders®’ apples after 19 weeks of storage. Seven days after removal from storage, the amounts of the majority of volatile compounds increased as a result of the extra time spent under air conditions. This was, for example, the case with butyl acetate, pentyl acetate, butyl butanoate, hexyl acetate, hexyl propanoate, butyl hexanoate, hexyl butanoate and butyl octanoate. In general, for both periods at 20 °C, the ULO+4w atmosphere was the most efficient for achieving the regeneration and ULO-stored fruit got the lowest emission. These results concur with those from earlier works on ‘Fuji’ apples that showed that ULO+4w atmospheres helped to enhance the aroma profile (Altisent et al., 2008). However, it should be remark that in some cases, there were not significant differences among fruit stored in ULO+4w and ULO+2w.

After 30 weeks of storage (Table 3), fruit stored under ULO atmosphere conditions produced fewer straight-chain esters than fruit stored under ULO+2w and ULO+4w. On the contrary as found after 19 weeks of storage (Table 2), for fruit stored for 30 weeks an extra period of two weeks after ULO storage was enough to increase

production in most aroma compounds, following by a decline in the ULO+4w atmosphere after 7 days at 20 °C. As in the case of short term storage, maximum production was obtained after 7 days at 20°C. For alcohol emission (Table 4), in general, there were not significant differences among atmospheres and days at 20 °C after 19 weeks of storage. On the contrary, after 30 weeks of storage, differences were observed between 1 and 7 days at 20 °C, the emission at 7 days at 20 °C was superior than after 1 day. The pattern was similar to the straight-chain esters.

Table 2. Straight-chain ester emission ($\mu\text{g kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders®’ apples after 19 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C.

Volatile compounds	1 day at 20°C			7 days at 20°C		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Methyl acetate	8.4 Aa	10.8 Ab	13.9 Ab	18.9 Aa	28.7 Aa	29.3 Aa
Ethyl acetate	18.7 Aa	19.1 Aa	17.2 Aa	15.3 Aa	15.8 Aa	16.3 Aa
Propyl acetate	Traces	2.2 Ab	0.7 Ab	2.6 B	5.4 ABa	6.7 Aa
Methyl butanoate	nd	nd	0.6 A	nd	nd	nd
Ethyl butanoate	Traces	Traces	Traces	Traces	1.0 Aa	0.8 Aa
Propyl Propanoate	Traces	Traces	0.5 a	0.8 A	1.5 A	1.3 Aa
Butyl acetate	18.2 Cb	167.3 Ab	92.8 Bb	84.3 Ba	236.7 Aa	207.3 Aa
Butyl propanoate	4.7 Ba	30.0 Aa	13.2 Ba	8.0 Ba	19.8 Ab	17.1 ABa
Pentyl acetate	3.6 Ab	8.8 Ab	6.3 Ab	13.5 Ba	26.1 Aa	26.9 Aa
Butyl butanoate	1.4 Cb	38.9 Ab	24.8 Bb	27.6 Ba	55.4 Aa	51.6 Aa
Ethyl hexanoate	nd	nd	nd	0.8 A	1.5 A	1.5 A
Hexyl acetate	28.7 Bb	249.8 Ab	103.0 Bb	158.7 Ba	338.8 Aa	328.0 Aa
Propyl hexanoate	nd	nd	nd	4.0 B	3.6 B	14.3 A
Hexyl propanoate	0.7 Ab	15.7 Ab	6.3 Ab	22.9 Ba	41.3 Aa	40.9 Aa
Butyl hexanoate	2.1 Bb	83.4 Ab	56.8 Ab	111.9 Ca	168.0 Ba	235.4 Aa
Hexyl butanoate	4.5 Bb	139.5 Aa	99.4 Ab	123.7 Ba	182.7 Aa	213.7 Aa
Octyl acetate	nd	nd	nd	Traces	0.6 A	1.0 A
Pentyl hexanoate	Traces	4.2 Ab	4.4 Ab	10.8 A	16.1 Aa	17.9 Aa
Hexyl hexanoate	5.1 Bb	65.6 Ab	85.7 Ab	102.5 Ba	140.9 ABa	160.2 Aa
Butyl octanoate	0.8 Ba	6.2 ABb	8.9 Ab	5.4 Ba	15.2 Aa	15.1 Aa
Hexyl octanoate	Traces	6.6 Aa	3.5 Aa	3.3 A	5.8 Aa	4.7 Aa

Means in the same row for a given shelf-life period showing different capital letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different lower case letters in a row for a given atmosphere are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$; nd: not detected

Table 3. Straight-chain ester emission ($\mu\text{g kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders[®]’ apples after 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C.

Volatile compounds	1 day at 20°C			7 days at 20°C		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Methyl acetate	17.8Bb	20.9ABa	31.1Aa	30.4Aa	30.5Aa	24.0Aa
Ethyl acetate	29.9Ba	26.8Bb	42.5Aa	30.4Ba	55.2Aa	27.7Bb
Propyl acetate	Traces	3.0Ab	1.6Ab	6.5Ba	11.6Aa	8.9ABa
Methyl butanoate	Traces	2.1	Traces	nd	nd	nd
Ethyl butanoate	Traces	0.7	Traces	1.6Ba	3.3Aa	1.5Ba
Propyl Propanoate	0.5Bb	2.3Ab	1.0ABb	2.6Ba	5.9Aa	3.4Ba
Butyl acetate	32.2Bb	96.8Ab	57.9ABb	153.4Ba	231.2Aa	202.0ABa
Butyl propanoate	6.3Bb	20.1Ab	7.7Bb	24.8Ba	40.3Aa	23.8Ba
Pentyl acetate	11.2Ab	14.3Ab	9.1Ab	42.2Aa	45.6Aa	42.4Aa
Butyl butanoate	14.4Bb	26.8Ab	26.6Ab	87.0Aa	93.6Aa	84.4Aa
Pentyl propanoate	Traces	1.8	Traces	4.2AB	4.6Aa	3.5Ba
Hexyl acetate	90.2Ab	165.3Ab	131.0Ab	386.2Aa	451.6Aa	400.6Aa
Propyl hexanoate	4.2Bb	23.3Ab	5.6Bb	23.2Ba	32.0Aa	28.8Aa
Hexyl propanoate	20.7Ab	36.6Ab	28.7Ab	97.2ABa	103.7Aa	84.1Ba
Butyl hexanoate	72.2Bb	99.0ABb	129.5Ab	290.7Ba	364.0Aa	337.2Aa
Hexyl butanoate	107.6Ab	164.2Ab	177.4Ab	426.0Aa	417.2Aa	296.3Ba
Ethyl octanoate	nd	nd	nd	1.1A	1.5A	1.6A
Octyl acetate	1.5Aa	0.6Ba	Traces	0.9Ab	1.1Aa	1.0Aa
Pentyl hexanoate	7.9Ab	11.7Ab	12.3Ab	38.0ABa	43.7Aa	32.4Ba
Hexyl hexanoate	65.6Cb	122.8Bb	194.4Aa	250.6Aa	267.8Aa	223.2Aa
Butyl octanoate	8.4ABb	15.4Ab	7.4Bb	21.1Ba	23.4ABa	29.6Aa
Hexyl octanoate	3.5Aa	2.5Aa	3.8Aa	2.3Aa	3.1Aa	3.1Aa

Means in the same row for a given shelf-life period showing different capital letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different lower case letters in a row for a given atmosphere are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Traces $\leq 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$; nd: not detected

Table 4. Alcohol emission ($\mu\text{g kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders[®]’ apples after 19 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C.

Volatile compounds	1 day at 20°C			7 days at 20°C		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Ethanol	18.2Aa	22.3Aa	20.5Aa	15.4Aa	17.1Aa	18.3Aa
1-Propanol	0.6Aa	1.1Aa	0.9Aa	2.0Aa	3.9Aa	3.1Aa
2-Methyl-1-propanol	1.3Aa	2.2Aa	2.6Aa	2.1Aa	2.3Aa	3.0Aa
1-Butanol	11.9Ba	34.1Aa	7.9Bb	13.9Ba	33.0Aa	31.3Aa
2-Methyl-1-butanol	2.9Aa	6.3Aa	6.6Aa	6.6Aa	10.8Aa	11.9Aa
1-Pentanol	1.8Aa	1.7Aa	1.6Aa	1.8Aa	2.9Aa	3.0Aa
2-Heptanol	nd	4.2Aa	2.4Ab	6.5B	9.2ABa	15.4Aa
1-Hexanol	1.5Ab	3.5Ab	5.0Ab	14.2Aa	17.2Aa	15.9Aa
2-Ethyl-1-hexanol	4.9Aa	4.5Aa	4.5Aa	1.8Aa	5.3Aa	4.7Aa

Means in the same row for a given shelf-life period showing different capital letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different lower case letters in a row for a given atmosphere are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). nd: not detected

Table 5. Alcohol emission ($\mu\text{g kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders’[®] apples after 30 weeks of cold storage under different storage conditions (ULO, ULO+2weeks in air and ULO+4weeks in air) plus 1 and 7 days at 20°C.

Volatile compounds	1 day at 20°C			7 days at 20°C		
	ULO	ULO+2w	ULO+4w	ULO	ULO+2w	ULO+4w
Ethanol	20.5Aa	29.9Aa	25.9Aa	21.0Ba	35.0Aa	23.4Ba
1-Propanol	1.3Ab	2.9Ab	1.2Ab	6.6Ba	13.1Aa	6.0Ba
2-Methyl-1-propanol	4.1Bb	8.0Ab	8.6Aa	7.6Ba	11.4Aa	7.7Ba
1-Butanol	19.1Bb	29.8Ab	6.5Bb	47.7Aa	63.7Aa	52.4Aa
2-Methyl-1-butanol	5.6Bb	17.9Ab	12.5Ab	30.0Ba	41.5Aa	24.7Ba
1-Pentanol	1.8Bb	4.0Ab	1.2Bb	5.0Ba	7.2Aa	6.7ABa
2-Heptanol	3.5Ab	7.8Ab	4.7Ab	39.9Aa	38.0Aa	26.5Ba
1-Hexanol	9.1Bb	12.0Bb	18.2Ab	31.4Ba	37.2Aa	21.4Ca
2-Ethyl-1-hexanol	13.8Aa	1.6Ba	3.5Bb	12.7Aa	5.0Ba	9.2ABa

Means in the same row for a given shelf-life period showing different capital letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different lower case letters in a row for a given atmosphere are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Table 6. Volatile compounds, acetaldehyde content and enzyme activities codes used in the multivariate analysis.

Volatile compounds	code	Volatile compounds	code
Ethyl acetate	eA	Ethanol	etOH
Ethyl butanoate	eB	1-Butanol	bOH
Butyl acetate	bA	1-Hexanol	hxOH
Butyl propanoate	bPr	Acetaldehyde	AA
Butyl butanoate	bB	LOX flesh tissue	LOX flesh
Ethyl hexanoate	eHx	LOX skin tissue	LOX skin
Hexyl acetate	hxA	HPL flesh tissue	HPL flesh
Hexyl propanoate	hxPr	HPL flesh tissue	HPL flesh
Butyl hexanoate	bHx		
Hexyl butanoate	hxB		
Ethyl octanoate	eO		
Hexyl hexanoate	hxHx		
Butyl octanoate	bO		
Hexyl octanoate	hxO		

As other authors have previously noted (López et al., 1998), butyl acetate, hexyl acetate, ethyl propionate, ethyl acetate and propyl acetate tend to be the predominant ester volatile compounds and 1-hexanol, ethanol and 1-butanol were the main alcohol volatile compounds in ‘Golden Delicious’ apples. Furthermore, the combination of butyl acetate and hexyl acetate represented 60% of the total aromatic components in ‘Golden Delicious’ ripened fruit (Brackman et al., 1993). Previous studies in different varieties of apples revealed that most esters that were common among them had a

common feature, they each have only two, four or six carbons in the alcohol (Young et al., 2004).

In order to predict emissions of these esters, alcohols and acetaldehyde content based on aroma-related enzyme activities and to know which of these activities have the greatest influence on volatile production, a PLSR model was developed (Figure 5). In this PLSR model, the emissions of the mentioned straight-chain esters, alcohols and acetaldehyde content were considered as Y variables and the LOX and HPL activities as the potentially explanatory variables (X variables). Both skin and flesh tissues were analyzed and included in the model. This regression model was able to explain up to 75% of total variability in the production of these volatile compounds. Figure 5 shows that the LOX activity in flesh tissue had a major influence on the emission of the volatile compounds that are most characteristic of this variety. Moreover, some good correlations were observed between esters and their alcohol precursors. For example, 1-butanol correlated with butyl propionate ($r = 0.95$), butyl butanoate ($r = 0.98$) and butyl hexanoate ($r = 0.96$). 1-Hexanol was well related to hexyl acetate ($r = 0.92$), the main volatile compound in the profile of 'Golden Delicious' and also to hexyl butanoate ($r = 0.95$) and hexyl hexanoate ($r = 0.92$). This confirmed that ester emission is related to the availability of alcohol precursors, as suggested in other works (Lara et al., 2003). Production of acetate esters was inversely related to AA content, as would be expected if AA was indeed being consumed as a substrate for their biosynthesis.

The work presented demonstrates that the ultra low oxygen storage plus an additional period under air conditions modified the biosynthesis of straight-chain esters during storage of 'Golden Reinders[®]' apples. Therefore, this increase in the most characteristic esters associated with this variety can lead to a better flavour and consequently to a greater consumer satisfaction. The increase in ethyl, butyl and hexyl esters analyzed was closely related to LOX activity in the flesh tissue.

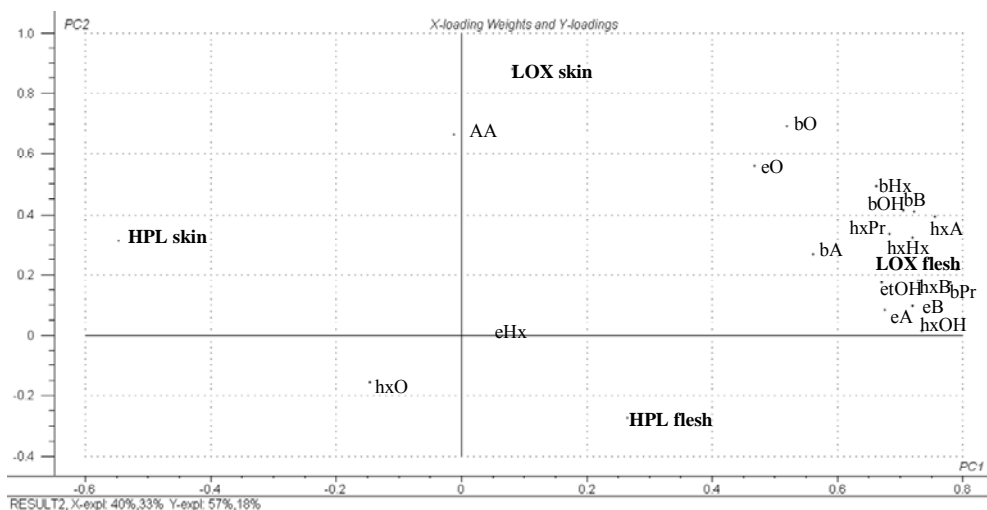


Figure 5. Loading weights plot of PC1 versus PC2 for a PLSR model of LOX and HPL activities (X variables) versus ester and alcohol emission and acetaldehyde content (Y variables) for ‘Golden Reinders’[®] apples after cold storage plus 7 days at 20°C. Variables are coded in Table 6.

4. Acknowledgements

R. Altisent is the recipient of a government grant from Spain’s *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA). This work was financially supported by the INIA through project RTA2005-00050-00-00.

5. References

- Altisent, R.; Graell, J.; Lara, I.; López, L.; Echeverría, G.** 2008. Regeneration of volatile compounds in ‘Fuji’ apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8490-8497.
- Altisent, R.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, L.; Lara, I.** 2009. Lipoxigenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of ‘Fuji’ apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4305-4312.
- Brackmann, A.** 1989. Effect of different CA conditions and ethylene levels on the aroma production of apples. *Acta Horticulturae*, 258, 207-214.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apple after long-term controlled atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brückner, B.** 2008. Consumer acceptance of fruit and vegetables: the role of flavour and other quality attributes. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie S. G., Eds.; CRC Press: Washington, DC; pp 11-18.
- Buttery, R. G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavour of tomato and other vegetables and fruits. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*; Acree, T. E., Teranishi, R., Eds.; ACS Professional: Washington, DC; pp 259-286.
- Burdock, G. A.** 2002. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 4th ed. CRC Press: Boca Raton, FL.
- CAMO ASA.** 1997. *Unscrambler Users Guide, ver. 7.6. Programme Package for Multivariate Calibration*. Trondheim, Norway.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus x domestica* Borkh) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5694-5701.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Dirinck, P.; Schamp, N.** 1989. Instrumental aroma analysis for objective evaluation of the parameters influencing aroma formation in apples and for prediction of the optimum picking date. *Acta Horticulturae*, 258, 421-428.
- Fan, X.; Mattheis, J. P.; Buchanan, D.** 1998. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1959-1963.
- Fazzalari, F. A.** 1978. *Compilation of Odor and Taste Threshold Data*. ASTM Data series DS 48.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Bostick, B.; Mattheis, J. P.; Patterson, M.** 1993. Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low-oxygen atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 3, 201-214.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1994. Synthesis of aroma compounds by controlled atmosphere (CA) stored apples supplied with aroma precursors: Alcohols, acids and esters. *Acta Horticulturae*, 368, 142-149.
- Kakiuchi, N.; Moriguchi, S.; Fukuda, H.; Ichimura, N.; Kao, I.; Banba, I.** 1986. Composition of volatile compounds of apple fruits in relation to cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55, 280-289.

- Ke, D.; Yahia, E. M.; Mateos, M.; Kader, A. A.** 1994. Ethanolic fermentation of 'Barlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 976-982.
- Kondo, M.; Oyama-Okubo, N.; Ando, T.; Marchesi, E.; Nakayama, M.** 2006. Floral scent diversity is differently expressed in emitted and endogenous compounds in *Petunia axillaris* lines. *Annals of Botany*, 98, 1253-1259.
- Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 29-39.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.
- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2007. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6087-6095.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: Golden Delicious and Granny Smith. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M.; Lavilla, T.; Graell, J.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Effect of different CA conditions on aroma and quality of Golden Delicious apples. *Journal of Food Quality*, 22, 583-597.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- Lurie, S.; Pre-Aymard, C.; Ravid, U.; Larkov, O.; Fallik, E.** 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv. Anna apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4251-4256.
- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley J. and Sons., Eds.; Chichester, U.K.; pp 116-165.
- Matich, A.; Rowan, D.** 2007. Pathways analysis of branched-chain esters biosynthesis in apples using deuterium labeling and enantioselective gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2727-2735.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- Moya-León, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C.; Pereira, M.; Moggia, C.** 2007. Development of aroma compounds and sensory quality of 'Royal Gala' apples during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 403-413.

- 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.
- Olías, J. M.; Sanz, L. C.; Rios, J. J.; Pérez, A. G.** 1992. Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in Golden Delicious apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 266-270.
- Poll, L.; Hansen, K.** 1990. Reproducibility of headspace analysis of apples and apple juice. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 23, 481-483.
- Rowan, D.; Lane, H.; Allen, J.; Fielder, S.; Hunt, M.** 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3276-3285.
- Rowan, D.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M.** 1999. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labelled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2553-2562.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wylie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W.** 1998. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Hrsg: Garching, Germany.
- Sanz, C.; Olías, J. M.; Pérez, A. G.** 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*; Tomás-Barberán, F. A., Robins, R. J., Eds.; Clarendon Press: Oxford, U.K.; pp 125-155.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schaffer, R. J.; Friel, E. N.; Souleyre, E. J. F.; Bolitho, K.; Thodey, K.; Ledger, S.** 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apples is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144, 1899-1912.
- Schnabel, K. O.; Belitz, H. D.; Von Ranson, C.** 1988. Investigations on the structure-activity relationships of odorous substances. Part 1. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen function. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 187, 215-223.
- Song, J.; Bangerth, F.** 1994. Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity. *Acta Horticulturae*, 368, 150-159.

- Souleyre, E. J. F.; Greenwood, D. R.; Friel, E. N.; Karunairetnam, S.; Newcomb, R. D.** 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv. 'Royal Gala'), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavour. *FEBS Journal*, 272, 3132-3144.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 471-477.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ling, L.** 1996. Odour thresholds of various branched and straight chain acetates. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 677-680.
- Van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. H.** 1977. *Compilation of Odour Threshold Values in Air and Water*. National Institute for Water Supply: Voorburg, The Netherlands.
- Vick, B. A.** 1991. A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, 26, 315-320.
- Villatoro, C.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2008. Long-term storage of Pink Lady apples modifies volatile-involved enzyme activities: consequences on production of volatile esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9166-9174.
- Wyllie, S. G.** 2008. Flavour quality of fruit and vegetables: are we on the brink of major advances?. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; CRC Press: Washington, D.C.; pp 3-11.
- World Apple Review.** 2007. Belrose Inc.-1045 N.E. Creston Lane, Pullman.
- Young, J. C.; Chu, C. L. G.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.

CAPÍTULO 7

Shelf-life Potential of 'Golden Reinders'[®] Apples after Ultra Low Oxygen Storage: Effect on Aroma Volatile Compounds, Standard Quality Parameters, Sensory Attributes and Acceptability.

Rosa Altisent, Gemma Echeverría, Isabel Lara, Luisa López y Jordi Graell
Publicado en: *Food Science and Technology International* 15 (2009), 481-493

Abstract

The aim of this work was to estimate shelf-life potential of 'Golden Reinders' apples after cold storage in ultra low oxygen (ULO). Fruits, corresponding to two different maturity stages, were kept at 1 °C in ULO atmosphere (1% O₂:1% CO₂) for 7 months and maintained at 20 °C for 28, 21, 14, 7 and 0 days. Firmness, soluble solids content (SSC) and titratable acidity (TA) of fruit presented proper values throughout the post-storage ripening period. Production of aroma volatile compounds was low for shorter ripening periods, though it increased progressively as ripeness advanced. Principal component analysis showed that the variables that positively influenced acceptability were: octyl acetate, hexyl octanoate, butyl propanoate, propyl pentanoate and 6-methyl-5-hepten-2-one as aroma volatile compounds; SSC, TA, firmness and Hue (SS) as physicochemical parameters; and sourness and sensory firmness as sensory attributes. In addition, a close correlation was observed between instrumentally and sensorially measured firmness.

1. Introduction.

Nowadays, apples of ‘Golden’ group are planted in all the major apple growing areas of the world. From a grower's perspective, ‘Golden’ apple is an attractive proposition – large crops and fruit which can be stored in ULO atmospheres and maintain good quality for a long time after harvest (López et al., 2000). Although these previous points would be of little interest to consumers, but these apples are also exceptionally sweet and crisp and have an attractive appearance. However, fruit quality is also strongly dependent on storage and shelf-life conditions. The shelf-life of apples is affected by a number of previous factors, including associated growing, harvesting and/or storage technologies. The goal of storage must be to extend “keepability” while maintaining or enhancing consumer acceptability. Storage technology of apples has been the subject of many studies. In general, regimes have been optimized to minimize losses due to physiological disorders and maximize the retention of firmness during long term storage. However, apples stored for long periods must also meet consumer expectations (Hoehn et al., 2003).

The influence of maturity stage, storage conditions, and storage period on consumer acceptability has also been the subject of different works (Plotto et al., 1995; Saftner et al., 2002). Previous studies of our group tended to focus on the characteristics of different varieties of apples immediately after they were removed from different periods of cold storage under different conditions and included studies about the effects of the harvest date and short shelf-life periods (López et al., 2000; Echeverría et al., 2004a, b, c). Thus, ‘Golden Delicious’ apples stored under ULO atmosphere showed low aroma volatile emission after long storage following 5 days of shelf-life (López et al., 1999). However, fresh apples are often stored or displayed commercially for as long as their appearance remains acceptable. This external quality (appearance) may last longer than internal quality characteristics such as flavour (aroma and taste) and texture. While external quality drives initial sales, repeat purchases are based on internal quality factors including texture and flavour (Stow, 1995). Flavour is a complex trait, few studies have been done correlating instrumental (volatile compounds and standard quality) and sensory measurements (Echeverria et al., 2004a, b) for short-medium shelf-life periods; however, insufficient information is available about the development of the flavour and its influence on consumer preferences after longer shelf-life periods.

In this study, we investigated the effect of different shelf-life periods on the emission of aroma volatile compounds and standard quality parameters of ‘Golden Reinders[®]’ apples harvested at two different maturity stages and stored in ULO atmosphere. We also aimed at deepening in the relationships between these instrumental measurements and sensory attributes, as well as in their influence on consumer acceptability.

2. Materials and methods

Plant Material and Storage Conditions

‘Golden Reinders[®]’ apples were harvested at two different dates, at 147 (harvest 1, H1) and 155 (harvest 2, H2) days after full bloom (dafb), corresponding to the commercial harvest window in the area, from 5 year-old trees grown on M-9 EMLA rootstock in an experimental orchard (IRTA-Experimental Station of Lleida, NE Spain). For H1 fruit, starch index averaged 4.53 (scale 1-10), firmness was 73.11 N and acidity represented 5.39 g malic acid/L. For H2 fruit, starch index averaged 5.73 (scale 1-10), firmness was 73.11 N and acidity was 3.64 g malic acid L⁻¹. Fruit from harvest 1 significantly presented higher values of starch index, firmness and acidity than fruit from harvest 2. Therefore, these two harvest dates correspond to two different maturity stages of the fruit. Immediately after each harvest, a batch of apples was selected for uniformity and absence of defects and stored at 1 °C and 92-93 % relative humidity in a cold room under ultra-low oxygen (ULO) conditions (1% O₂:1% CO₂) for 7 months. Fruit were subsequently kept at 1 °C in regular air for up to 28 days. Sub-batches were removed weekly and transferred to 20 °C, so that the shelf-life periods at room temperature were 28, 21, 14, 7 and 0 days. Standard quality parameters, volatile compounds and sensory measurements were analysed.

Sensory Measurements

Sensory evaluation was performed on two different days, the first one for H1 fruit and the second one for H2 sample. Twenty apples per shelf-life period were used for the sensory analyses per each harvest date. Before sensory evaluation, and after colour and firmness measurements, two longitudinal wedges were removed from each fruit to be analyzed instrumentally for soluble solids concentration (SSC) and titratable acidity (TA). The rest of the fruit was divided in three pieces for consumer evaluation as

explained below. For each harvest date, five pieces (1 per each shelf-life period) were placed on white plates and immediately presented to a taste panel of 50 consumers (29 women and 21 men). Each piece was identified by a random three-digit code. The order of presentation of the 5 parts on the white plate was randomized for each consumer. Mineral water was used as palate cleansers between samples. Consumers were volunteers among the staff working in the UdL-IRTA research institute and the University of Lleida. All participants were every-day apple consumers.

The consumers assessed all 5 samples and were asked to rate overall fruit acceptability according to a hedonic test (9, like very much; ...; 1, dislike very much). Sensory firmness, sourness and sweetness were also evaluated with a test in which consumers were requested to order the samples from weak to strong perception of each attribute considered. According to methodology described by Anzaldúa-Morales (1994), the scores used for the sorting of the 5 samples presented to each panellist were -1.16, less perception; -0.5, 0, 0.5, 1.16 more perception. The samples could be retasted as often as desired. All evaluations were conducted in individual booths under white illumination and at room temperature.

Standard Quality Parameters

As explained in the previous paragraph, parts from twenty fruit per shelf-life period and harvest date were individually assessed in the analyses of flesh firmness, SSC, TA and skin colour (Hue), both at harvest and before sensory evaluation, for each shelf-life period and harvest date. Flesh firmness was measured on opposite sides of each fruit with a penetrometer (Effegi, Milan, Italy) equipped with an 11-mm diameter plunger tip; results were expressed in N. SSC and TA were measured in juice pressed from the fruit. SSC was determined with a hand refractometer (Atago, Tokyo, Japan), and results were expressed as % sucrose in an equivalent solution. TA was determined by titrating 10 mL of juice with 0.1 N NaOH to pH 8.1 using phenolphthaleine 1% and the results were given as g malic acid L⁻¹. Epidermis colour was determined with a portable tristimulus colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta Corp, Osaka, Japan) using CIE illuminant D₆₅ and with an 8 mm measuring aperture diameter. Epidermis colour was measured at the equator of each fruit and results were expressed as Hue angle (tan⁻¹ b*/a*).

Analysis of Aroma Volatile Compounds

Eight kg of apples (2 kg/replicate \times 4 replicates), per shelf-life period and harvest date, were taken for analysis of aroma volatile compounds before sensory evaluation. For the extraction of aroma volatile compounds, intact fruits from each treatment were placed in a 8-L Pyrex container through which an air stream (900 mL min⁻¹) was passed for 4 h; the effluent was then recovered in an adsorption tube (ORBO-32™; SUPELCO, Bellefonte, PA) filled with 100 mg of activated charcoal (20/40 mesh), from which volatile compounds were desorbed by agitation for 40 min with 0.5 mL diethyl ether. Sampling time was optimized as described in Echeverria et al. (2008). The identification and quantification of aroma volatile compounds was performed on a gas chromatograph H-P 5890 series II (Hewlett-Packard Co., Barcelona, Spain) equipped with a flame ionisation detector (GC-FID), using a cross-linked FFAP capillary column (50m \times 0.2mm \times 0.33 μ m). The oven program was set at 70 °C (1 min) and the temperature was first raised by 3 °C min⁻¹ to 142 °C and then by 5 °C min⁻¹ to 225 °C. This last temperature was then maintained at a constant level for 10 min. Helium was used as the carrier gas (0.8 mL min⁻¹), with a split ratio of 40:1, in the presence of air (400 mL min⁻¹) and H₂ (32 mL min⁻¹). The injector and detector (FID) were kept at 220 °C and 240 °C, respectively. The compounds were identified by comparing their respective retention indices with those of standards, and by enriching apple extract with authentic samples. Quantification was carried out using butylbenzene (assay >99.5%, Fluka) as an internal standard. Spectra were recorded with a Hewlett-Packard 3398GC Chemstation. The identity of the aroma volatile compounds was confirmed by comparing their GC retention indices and their mass spectra with those of an external standard injected in a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) under the same conditions and also by comparing the spectra with those from a database (NIST HP59943C original mass spectral library). Retention indices were calculated through GC analysis of a solution of 24 aliphatic hydrocarbons (C₈ to C₃₂; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in hexane under the same conditions as for the volatile samples according to Kovats (1958). The standards of the highest quality available were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) unless otherwise indicated. Butyl acetate, pentyl acetate, ethyl butanoate, *tert*-butyl propanoate, 1-propanol, 1-butanol, 1-hexanol and 2-methyl-1-propanol were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Ethanol was from Panreac Química, S.A. (Castellar del Vallès, Spain) and 2-methylpropyl acetate was

obtained from Avocado Research Chemicals Ltd. (Madrid, Spain). GC-MS were equipped with the same capillary columns used in the GC-FID analyses. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. Helium was used as the carrier gas (0.8 mL min^{-1}). Concentration of each volatile compound was expressed as μg per kg of fruit.

Statistical Analysis

The experiment was conducted using a completely randomized design, with four replicates of 2 kg of fruit (volatile compounds) and 20 additional fruit (standard quality) per shelf-life period and harvest date. For sensory evaluation 50 consumers were used as replication in statistical analysis. All data were subjected to analysis of variance (GLM-ANOVA procedure) using the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1988). Means were separated by the LSD test at $P \leq 0.05$. For multivariate analysis, samples were characterized by their average measurements (instrumental analyses) or by the average scores from consumers (sensory analyses) for each variable considered. A Principal Component Analysis (PCA) was performed involving 10 samples and 46 variables (38 aroma volatile compounds, 4 physicochemical parameters, 3 sensory attributes and acceptability). Partial least-square regression (PLSR) was used to quantify the correlation between instrumentally measured firmness and sensory firmness. The Unscrambler vers. 6.11a software was used (CAMO ASA, Norway, 1997) to develop these models. Firmness was used as the X variable, and correlated with sensory firmness as the Y variable, applying PLS1 regression. As a pre-treatment, data were centred and weighted by the inverse of the standard deviation of each variable in order to avoid dependence on measured units (Martens and Naes, 1989). Aroma volatile compound codes are listed in Tables 1 and 2. Standard quality parameter codes are listed in the Material and Methods' section.

3. Results and discussion.

Influence of Different Shelf-life Periods and Maturity Stages on Standard Quality Parameters

Figure 1 shows the evolution of standard quality parameters during the different shelf-life periods. Fruit harvested at H1 showed stable firmness values (60-63 N) until 21 days at 20 °C. In contrast, and as expected, for fruit harvested later (H2), firmness

steadily decreased during post-storage ripening, reaching values of less than 55 N after 28 days at 20 °C, possibly resulting from changes in cell wall polysaccharides. Despite these results, there were not significant differences between both maturity stages.

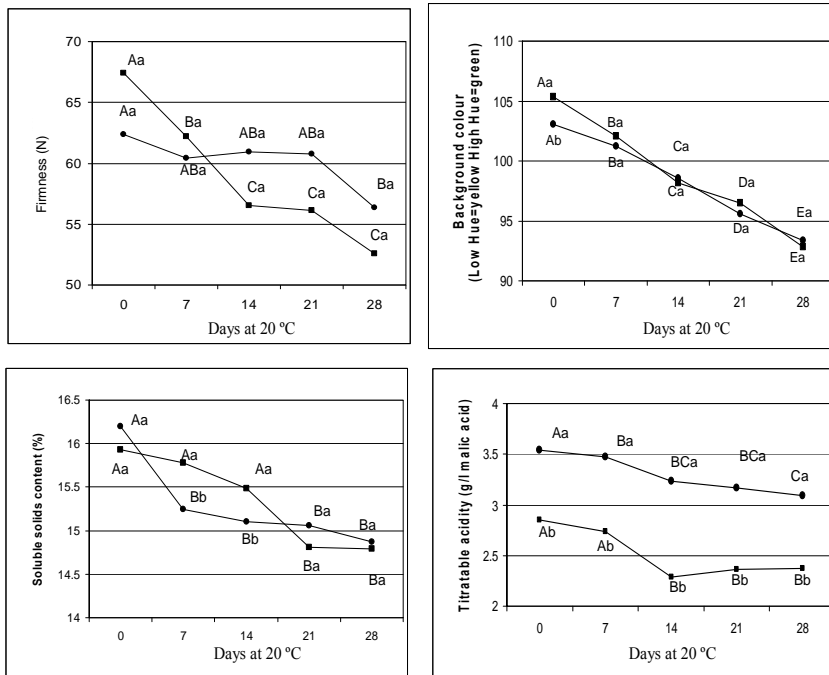


Figure 1. Evolution of standard quality measurements in 'Golden Reinders'[®] apples for different shelf-life periods at 20 °C after storage under ULO atmosphere and two harvest dates: H1 (●) and H2 (■). Means within the same harvest date followed by the same capital letters and means within the same days after storage at 20°C followed by the same small letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD Tukey's test).

As far as SSC was concerned, we observed a decrease in this parameter throughout the ripening period in apples harvested at both maturity stages (Figure 1). This small decline could be explained by fruit respiration during shelf-life, since sugar and other fruit metabolites are depleted during respiration, contributing to a loss of fruit value and reserves. That could contribute to a consequent deterioration in sensory quality of fruit (Crisosto et al., 1993). SSC values varied from 16.2 to 14.8% for apples from H1 and from 15.9 to 14.8% for apples from H2. This decline in the SSC was accompanied by a slight reduction in TA, from 3.5 to 3 g L⁻¹ (in fruit from H1) and from 2.8 to 2.3 g L⁻¹ (for fruit from H2). Results for both maturity stages show that H1 fruit kept high values of acidity compared with H2 fruit all through the shelf-life period.

Moreover, SSC was similar between both maturity stages for the longest periods at 20 °C (21 and 28 days).

Due to the relative lack of variation in some of the parameters traditionally used to ensure good quality (firmness, SSC, and TA) and therefore to satisfy consumers requirements, some authors have recommended the use of epidermis colour to predict an appropriate eating quality in apples (Iglesias et al., 2000). Thus, in this work, hue angle (used as an indicator of the shift from green to yellow in the tonality of the background colour) gradually decreased with along shelf-life period, the longer the period at 20 °C, the more advanced the ripening stage of the fruits will be. In general, for this parameter no differences were found between both maturity stages except at the time of fruit removal from cold storage.

According to Hoehn et al. (2003), acceptable eating quality for 'Golden Delicious' apples should attain a minimum of 12% for total soluble solids, acidity of 3.2 g L⁻¹ (malate) and 44 N for firmness. Our data show that H1 and H2 fruit kept SSC and firmness above these values through out the period at 20°C but acidity values were appropriate only for H1 fruit.

Influence of Different Shelf-life Periods and Maturity Stages on Aroma Volatile Compounds.

Ripening is a process involving physical, metabolic, and biochemical changes initiated and/or co-ordinated by ethylene, either on or off the tree, and includes loss of background green colour, softening of fruit tissue, and the development of characteristic aroma and flavour (Wills et al., 1997).

In this study, 38 aroma volatile compounds (29 esters, 7 alcohols, 1 ketone and 1 sesquiterpene) were identified and quantified during the ripening of 'Golden Reinders'[®] apples at different shelf-life periods and for both maturity stages (Table 1 and 2). The straight esters: hexyl acetate, butyl acetate, hexyl butanoate and butyl hexanoate; branched esters: hexyl 2-methylbutanoate and 2-methylbutyl acetate; and alcohols: 1-hexanol and 1-butanol were all prominent among the identified compounds, accounting for 77-84% of total volatile compounds. The importance of acetate esters in many apple cultivars was also reported by others (Boylston et al., 1994; Mattheis et al., 1995). Considering that log₁₀ odour units for the above-mentioned aroma volatile compounds are positive, they could all be considered to contribute to the characteristic flavour of

this cultivar (Buttery, 1993), especially for longer shelf-life periods (14, 21 and 28 days at 20 °C).

Other compounds that made a large contribution to the specific varietal aroma of 'Golden Reinders[®]' apples during ripening were ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, butyl butanoate and butyl 2-methylbutanoate, because despite the low concentrations of these compounds observed in this study, they had positive log₁₀ odour units and consequently contributed to the typical flavour of these apples. The importance of some of these compounds was also reported in previous works by Rizzolo et al. (2006), who observed that ethyl and hexyl 2-methylbutanoate and hexyl and 2-methylbutyl acetate contributed to the characteristic aroma of 'Golden' apples.

Most of the aroma volatile compounds (68.4%) referred to in this work for apples from H1 presented a progressive increase during fruit ripening after post-storage (Table 1). The increase in volatile acetate esters during ripening was also reported in previous reports on 'Fuji' apples (Fellman et al., 2000). On the other hand, 71% of aroma volatile compounds emitted by apples from H2 increased their concentration until 21 days of ripening at 20°C following a decrease in the case of longer ripening periods (Table 2).

Typical aroma volatile compounds increase in concentration during climacteric ripening, reaching maximum values at the climacteric (Dixon and Hewett, 2000). This is in line with the results presented above, since physiologically more immature apples from shorter ripening periods released low concentrations of volatiles for both harvests. Apples at a more advanced ripening stage, from H2 after longer shelf-life periods, emitted low and declining volatile concentrations.

The steady increase in the emission of major acetate esters: hexyl, butyl and 2-methylbutyl acetate, by 'Golden Reinders[®]' apples harvested at both harvest dates (147 and 155 dafb) was eased by the availability of the required alcohol precursors: 1-hexanol, 1-butanol and 2-methyl-1-butanol, respectively, whose concentrations also increased during fruit ripening (Table 1). The concentrations of these volatiles were largely dependent on harvest date and the length of post-storage ripening.

In general, throughout the shelf-life period, fruit harvested at H2 produced lower emission of total volatile compounds than fruit harvested earlier (H1), this decline varied between 17-62%, depending of shelf-life period. However, in the initial measurements when apples were removed from storage (0 days at 20 °C), this decrease

was not observed (Table 1 and 2). Similar results were also reported by Fellman et al. (2003) for 'Delicious' apples.

Influence of Different Shelf-life Periods and Maturity Stages on Consumer Acceptability and Sensory Attributes

Table 3 shows that fruits from H1 maintained for 7 and 14 days at 20 °C were more accepted by the consumers than those analysed at 0 days after storage. However, the consumer acceptability for fruit kept for 21 and 28 days at 20 °C did not show significant differences with respect to shorter shelf-life periods.

In the case of sensory firmness, Tables 3 and 4 show a decrease in perceived firmness throughout the shelf-life period. This perceived decline was significantly different at 21 and 14 days of ripening at 20 °C, respectively, for H1 and H2 fruit. Differences in firmness perceived by the consumers in H2 fruit were consistent with those measured instrumentally. According to Harker et al. (2002a), humans can detect differences in texture between two apples whose firmness differs by 4.9 N or more. However, in our case, the consumers detected differences that were smaller than 4.9 N.

Table 3. Acceptability and sensory attributes of 'Golden Reinders[®]' apples harvested after 147 dafb and stored for different shelf-life periods at 20 °C after storage under ULO atmosphere.

Days at 20 °C	Acceptability	Sourness	Sweetness	Sensory firmness
0 d	5.00 B	0.09 A	-0.18 B	0.52 A
7 d	6.00 A	0.25 A	-0.24 B	0.44 A
14 d	6.03 A	0.14 A	-0.06 B	0.29 A
21 d	5.48 AB	0.10 A	0.12 AB	-0.18 B
28 d	5.43 AB	-0.58 B	0.37 A	-0.29 B

Means followed by different letters within the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Table 4. Acceptability and sensory attributes of 'Golden Reinders[®]' apples harvested after 155 dafb and stored for different shelf-life periods at 20 °C after storage under ULO atmosphere.

Days at 20 °C	Acceptability	Sourness	Sweetness	Sensory firmness
0 d	5.84 A	0.64 A	-0.36 B	0.60 A
7 d	6.08 A	0.28 B	-0.21 B	0.53 A
14 d	6.03 A	-0.32 C	0.17 A	-0.21B
21 d	5.62 A	-0.21 C	0.19 A	-0.38 BC
28 d	5.35 A	-0.41 C	0.17 A	-0.54 C

Means followed by different letters within the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Table 1. Aroma volatile emission ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) by ‘Golden Reinders[®]’ apples harvested after 147 dafb (H1) and stored at different shelf-life periods after staying 7 months under ULO atmosphere. Values represent means of four replicates (ND.: non-detectable and Traces $\leq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Aroma compounds ^a	Code	Rt ^b	OTH (μgL^{-1}) ^c	0 days	7 days	14 days	21 days	28 days
ACETATES								
Methyl acetate	ma	834	8300(h)	10.94 A (-2.9)	18.68 A(-2.6)	16.37 A(-2.7)	10.69 A(-2.9)	12.21 A(-2.8)
Ethyl acetate	ea	898	13500(c)	18.16 C(-2.9)	20.97 C (-2.8)	30.52 C(-2.6)	80.43 B(-2.2)	144.87 A(-2)
Propyl acetate	pra	984	2000(c)	0.54 D(-3.6)	6.88 D(-2.5)	30.42 C(-1.8)	91.43 B(-1.3)	183.17 A(-1)
2-Methylpropyl acetate	2mpr	1020	65(b)	11.73 B(-0.7)	14.96 B(-0.6)	21.60 A(-0.5)	21.45 A(-0.5)	26.85 A(-0.4)
Butyl acetate	ba	1082	66(c)	41.24 D(-0.2)	158.08 D(0.4)	774.52 C(1.1)	1741.09 B(1.4)	2485.95 A(1.6)
2-Methylbutyl acetate	2mba	1131	11(b)	90.76 C(0.9)	289.43 C(1.4)	745.19 B(1.8)	1080.40 A(2)	1285.76 A(2.1)
Pentyl acetate	pa	1183	43(c)	11.59 C(-0.6)	27.62 C(-0.2)	91.34 B(0.3)	137.36 A(0.5)	149.14 A(0.5)
Hexyl acetate	hxa	1283	2(f)	150.34 C(1.9)	359.47 C(2.3)	1137.43 B(2.8)	2537.91 A(3.1)	2788.69 A(3.1)
Octyl acetate	oa	1484	12(i)	Traces(-1.5)	0.78 A(-1.2)	0.84 A(-1.2)	0.60 A(-1.3)	Traces(-1.4)
PROPANOATES								
<i>tert</i> -Butyl propanoate	tbpr	964	19(h)	5.55 B(-0.5)	7.17 B(-0.4)	8.36 B(-0.4)	5.07 B(-0.6)	14.73 A(-0.1)
2-Methylpropyl propanoate	2mprpr	1091		Traces	0.81 A	2.63 A	1.86 A	2.24 A
Butyl propanoate	bpr	1148	25(a)	0.82 D(-1.5)	2.05 C(-1.1)	3.41 A(-0.9)	3.10 AB(-0.9)	2.41 BC(-1)
BUTANOATES								
Ethyl butanoate	eb	1043	1(d)	0.68 D(-0.2)	2.99 D(0.5)	13.10 C(1.1)	35.60 B(1.6)	64.01 A(1.8)
Butyl butanoate	bb	1228	100(e)	26.87 C(-0.6)	61.07 C(-0.2)	233.59 B(0.4)	430.46 A(0.6)	432.16 A(0.6)
Pentyl butanoate	pb	1253	210(f)	0.98 C(-2.3)	3.36 C(-1.8)	7.62 B(-1.4)	11.14 A(-1.3)	13.03 A(-1.2)
2-Methylbutyl butanoate	2mbb	1337		7.50 D	22.50 CD	33.88 C	65.71 B	98.80 A
Hexyl butanoate	hb	1426	250(b)	185.52 C(-0.1)	253.45 C(0)	664.06 B(0.4)	1084.68 A(0.6)	949 AB(0.6)
2-METHYLBUTANOATES								
Ethyl 2-methylbutanoate	e2mb	1059	0,006(b)	1.38 D(2.4)	4.84 C(2.9)	5.00 C(2.9)	7.40 B(3.1)	11.16 A(3.3)
Butyl 2-methylbutanoate	b2mb	1240	17(e)	31.79 B(0.3)	128.90 B(0.9)	273.23 A(1.2)	385.27 A(1.4)	354.67 A(1.3)
Hexyl 2-methylbutanoate	hx2mb	1436	6(e)	276.61 B(1.7)	513.07 B(1.9)	1023.3 A(2.2)	1235.01 A(2.3)	928.41 A(2.2)
PENTANOATE								
Propyl pentanoate	prp	1290		7.10 B	22.24 A	29.14 A	28.04 A	21.91 A
HEXANOATES								
Methyl hexanoate	mhx	1199	70(f)	3.29 C(-1.3)	6.38 C(-1)	19.22 B(-0.6)	27.46 A(-0.4)	27.42 A(-0.4)
Ethyl hexanoate	ehx	1242	1(f)	1.03 C(0.01)	2.35 C(0.4)	10.21 B(1)	17.49 A(1.2)	15.79 A(1.2)
Butyl hexanoate	bhx	1423	700(e)	154.59 C(-0.7)	268.22 C(-0.4)	573.49 B(-0.1)	928.76 A(0.1)	876.47 A(0.1)
Pentyl hexanoate	phx	1520		14.99 C	25.26 C	55.02 B	70.73 A	55.90 B
Hexyl hexanoate	hxhx	1621		111.57 C	152.01 C	308.46 B	441.09 A	299.99 B
OCTANOATES								
Ethyl octanoate	eo	1444		ND	0.59 B	1.04 B	2.30 B	4.49 A
Butyl octanoate	bo	1623		14.03 C	17.58 C	33.50 B	46.39 A	49.95 A
Hexyl octanoate	hxo	1833		1.85 CD	1.69 D	3.16 AB	3.72 A	2.74 BC
ALCOHOLS, TERPENE AND KETONE								
Ethanol	eOH	932	100000(i)	12.81 B(-3.9)	14.71 B(-3.8)	14.73 B(-3.8)	27.14 A(-3.6)	31.70 A(-3.5)
1-Propanol	1prOH	1036	9000(a)	0.40 D(-4.4)	5.88 CD(-3.2)	26.38 C(-2.5)	94.01 B(-2)	193.76 A(-1.7)
2-Methyl-1-propanol	2mprOH	1095	250(f)	4.62 D(-1.7)	5.98 D(-1.6)	11.34 C(-1.3)	15.42 B(-1.2)	20.38 A(-1.1)
1-Butanol	1bOH	1144	500(a)	11.71 C(-1.6)	38.33 C(-1.1)	235.77 C(-0.3)	1336.45 B(0.4)	2018.27 A(0.6)
2-Methyl-1-butanol	2mbOH	1210	250(d)	5.79 D(-1.6)	18.31 D(-1.1)	62.01 C(-0.6)	132.56 B(-0.3)	174.44 A(-0.2)
1-Hexanol	hxOH	1357	500(f)	128.17 C(-0.6)	223.43 C(-0.3)	666.59 B(0.1)	1531.82 A(0.5)	1355.82 A(0.4)
2-Ethylhexanol	2ehxOH	1494	270000(i)	6.09 A(-4.6)	2.54 B(-5)	ND	ND	ND
6-Methyl-5-hepten-2-one	6m5h2o	1403	50 (j)	2.81 B(-1.3)	6.14 A(-0.9)	5.74 A(-0.9)	3.72 AB(-1.1)	1.37 B(-1.6)
α -Farnesene	farna	1761		ND	8.19 A	7.34 A	21.67 A	6.68 A
Total aroma volatiles				1354.63 C	2716.92 C	7179.55 B	13695.43 A	15104.81 A

* Means followed by different capital letters within the same row for a given compound are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different small letters for a given compound and shelf-life day between Tables 1 and 2 are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test). ^b Kovats retention index in cross-linked FFAP column (Poole and Poole 1993). ^c Odor threshold reported by: (a): Flath et al., 1967, (b): Takeoka et al., 1992, (c): Takeoka et al., 1996, (d): Rychlik et al., 1998, (e): Takeoka et al., 1990, (f): Buttery, 1993, (g): Van Gemert and Nettenbreijer, 1977, (h): Schnabel et al., 1988, (i) Fazzalari, 1978, (j) Buttery et al., 1990.

Table 2. Aroma volatile compounds emitted by ‘Golden Reinders[®]’ apples harvested after 152 dafb (H2) and stored at different shelf-life periods after staying 7 months under ULO atmosphere^a. Values represent means of four replicates (ND.: non-detectable and Traces $\leq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Aroma compounds ^a	Code	RI ^b	OTH (μgL^{-1}) ^c	0 days	7 days	14 days	21 days	28 days
ACETATES								
Methyl acetate	ma	834	8300(h)	17.68 Aa(-2.7)	18.47 Aa(-2.7)	10.92 ABa(-2.9)	5.21 Ba(-3.2)	14.20 Aa(-2.8)
Ethyl acetate	ea	898	13500(c)	40.94 Ba(-2.5)	6.25 Da(-3.3)	31.17 BCa(-2.6)	24.30 Cb(-2.7)	61.47 Ab(-2.3)
Propyl acetate	pra	984	2000(c)	0.71 Ca(-3.4)	2.29 Ca(-2.9)	23.45 Ba(-1.9)	58.30 Ab(-1.5)	59.26 Ab(-1.5)
2-Methylpropyl acetate	2mpr	1020	65(b)	8.43 Ca(-0.9)	6.82 Cb(-1)	12.49 Bb(-0.7)	20.12 Aa(-0.5)	11.32 Bb(-0.8)
Butyl acetate	ba	1082	66(c)	36.75 Da(-0.3)	61.71 Da(0)	454.25 Cb(0.8)	1091.98 Ab(1.2)	903.90 Bb(1.1)
2-Methylbutyl acetate	2mba	1131	11(b)	66.24 Ca(0.8)	147.85 Ca(1.1)	544.72 Ba(1.7)	1040.53 Aa(2)	612.97 Bb(1.7)
Pentyl acetate	pa	1183	43(c)	13.61 Ca(-0.5)	21.17 Ca(-0.3)	60.37 Bb(0.1)	108.47 Ab(0.4)	61.36 Bb(0.2)
Hexyl acetate	hxa	1283	2(f)	220.63 Ca(2)	196.44 Ca(2)	875.68 Ba(2.6)	1769.84 Ab(2.9)	995.26 Bb(2.7)
Octyl acetate	oa	1484	12(i)	Traces	Traces	0.99 Aa(-1.1)	1.35 Aa(-0.9)	Traces
PROPANOATES								
<i>tert</i> -Butyl propanoate	tbpr	964	19(h)	ND	ND	Traces	2.47 Ba(-0.9)	10.60 Aa(-0.3)
2-Methylpropyl propanoate	2mprpr	1091		0.65 Aa	0.64 Aa	1.48 Aa	1.97 Aa	0.80 Ab
Butyl propanoate	bpr	1148	25(a)	0.51 Ca(-1.7)	1.69 Ba(-1.2)	1.78 Ba(-1.1)	3.03 Aa(-0.9)	0.85 Ca(-1.5)
BUTANOATES								
Ethyl butanoate	eb	1043	1(d)	1.49 Ca(0.2)	1.51 Ca(0.2)	10.5 Ba(1.0)	30.06 Aa(1.5)	12.47 Bb(1.1)
Butyl butanoate	bb	1228	100(e)	36.52 Ca(-0.4)	45.97 Ca(-0.3)	171.12 Bb(0.2)	365.84 Ab(0.6)	144.80 Bb(0.2)
Pentyl butanoate	pb	1253	210(f)	1.57 Da(-2.1)	2.33 Da(-1.9)	4.86 Cb(-1.6)	9.51 Aa(-1.3)	6.17 Bb(-1.5)
2-Methylbutyl butanoate	2mbb	1337		11.08 Ca	11.71 Ca	27.20 Ba	49.92 Aa	20.68 Bc
Hexyl butanoate	hb	1426	250(b)	249.25 Ca(0)	249.62 Ca(0)	621.61 Ba(0.4)	1146.34 Aa(0.7)	414.37 Cb(0.2)
2-METHYLBUTANOATES								
Ethyl 2-methylbutanoate	e2mb	1059	0,006(b)	2.66 Ca(2.6)	3.27 Ca(2.7)	3.84 BCa(2.8)	7.29 Aa(3.1)	4.66 Bb(2.9)
Butyl 2-methylbutanoate	b2mb	1240	17(e)	52.09 Ca(0.5)	64.56 Ca(0.6)	202.25 Ba(1.1)	413.71 Aa(1.4)	167.31 Bb(1)
Hexyl 2-methylbutanoate	hx2mb	1436	6(e)	423.72 Ba(1.8)	393.63 Ba(1.8)	1062.23 Aa(2.2)	1273.37 Aa(2.3)	487.73 Bb(1.9)
PENTANOATE								
Propyl pentanoate	prp	1290		10.78 Ca	13.41 Ca	27.25 Ba	37.41 Aa	14.81 Cb
HEXANOATES								
Methyl hexanoate	mhx	1199	70(f)	4.06 Ca(-1.2)	4.58 Ca(-1.2)	17.01 Ba(-0.6)	33.57 Aa(-0.3)	8.33 Cb(-0.9)
Ethyl hexanoate	ehx	1242	1(f)	2.06 Ca(0.3)	2.17 Ca(0.3)	9.15 Ba(0.9)	17.61 Aa(1.2)	3.49 Cb(0.5)
Butyl hexanoate	bhx	1423	700(e)	180.85 Ca(-0.6)	184.87 Ca(-0.6)	447.06 Ba(-0.2)	631.51 Ab(-0.04)	243.34 Cb(-0.5)
Pentyl hexanoate	phx	1520		16.41 Ba	24.08 Ba	45.58 Aa	50.32 Ab	18.61 Bb
Hexyl hexanoate	hxhx	1621		76.81 Ca	172.71 Ba	265.01 Aa	275.07 Ab	122.46 Bc
OCTANOATES								
Ethyl octanoate	eo	1444		Traces	Traces	Traces	0.83 Ab	ND
Butyl octanoate	bo	1623		3.96 Bb	15.34 Ba	28.67 Aa	35.62 Ab	13.30 Bb
Hexyl octanoate	hx	1833		Traces	1.80 Ba	3.12 ABa	4.21 Aa	Traces
ALCOHOLS, TERPENE AND KETONE								
Ethanol	eOH	932	100000(i)	22.81 Ba(-3.6)	8.45 Ca(-4.1)	15.73 BCa(-3.8)	8.99 Cb(-4.0)	27.16 Aa(-3.6)
1-Propanol	1prOH	1036	9000(a)	1.69 Ca(-3.7)	3.71 Ca(-3.4)	19.69 Ba(-2.7)	55.13 Ab(-2.2)	62.89 Ab(-2.2)
2-Methyl-1-propanol	2mprOH	1095	250(f)	4.75 CDa(-1.7)	3.40 Da(-1.9)	5.63 Cb(-1.6)	12.90 Aa(-1.3)	9.96 Bb(-1.4)
1-Butanol	1bOH	1144	500(a)	31.51 Ca(-1.2)	25.99 Ca(-1.3)	253.72 Ba(-0.3)	554.64 Ab(0.05)	671.86 Ab(0.1)
2-Methyl-1-butanol	2mbOH	1210	250(d)	6.72 Da(-1.6)	12.17 Db(-1.3)	44.96 Cb(-0.7)	118.33 Ab(-0.3)	90.61 Bb(-0.4)
1-Hexanol	hxOH	1357	500(f)	227.46 CDa(-0.3)	157.08 Da(-0.5)	654.83 Ba(0.1)	1379.59 Ab(0.4)	336.43 Cb(-0.2)
2-Ethylhexanol	2ehxOH	1494	270000 (i)	4.15 Aa(-4.8)	ND	ND	ND	4.57 Aa(-4.8)
6-Methyl-5-hepten-2-one	6m5h2o	1403	50 (j)	Traces	1.89 Ab(-1.4)	0.82 Ab(-1.8)	1.50 Aa(-1.5)	Traces
α -Farnesene	farna	1761		23.99 Aa	20.47 Aa	19.95 Aa	10.25 Aa	79.57 Aa
Total aroma volatiles				1803.29 Ca	1888.68 Ca	5979.94 Ba	10651.09 Ab	5698.27 Bb

^a See footnote to Table 1.

Regarding sourness, H1 fruit showed a reduction at 28 days at 20°C, whereas for H2 apples this decline was already detected at 7 days at 20°C as expected from more mature fruit (Tables 3 and 4). People tend to be very sensitive to differences in fruit acidity, and studies have shown that differences between apples of as little as 0.08 % (0.8 g malic acid/L) can be detected by the average trained panellist (Harker et al., 2002b).

In this study, the perception of sweetness did not perfectly agree with SSC values obtained with a hand-refractometer. This could have been due to the fact that perceptions of sweetness can be affected by certain aroma compounds (Baldwin et al., 1998). Thus, fruit kept for 21 and 28 days at 20°C, which had the highest total aroma emissions (Tables 1 and 2), obtained higher sweetness scores (Tables 3 and 4) despite their lower SSC values (Figure 1).

Full-data PCA Model

PCA was performed to provide an easy visualisation of the complete data set in a reduced dimension plot and also to allow primary evaluation of the ripening stage at different shelf-life periods. For this analysis, all the variables studied in this work (aroma volatile compounds, standard quality parameters, sensory attributes and acceptability) were considered to characterise the fruit samples (Figure 2).

Principal components 1 (PC1) and 2 (PC2) accounted for 61 and 12%, respectively, of total variability. 'Golden Reinders[®]' apples showed a chronological distribution over PC1, with the exception of samples from the second harvest date (H2) that were kept for 28 days at 20 °C. Differences in distribution indicated samples at different ripening stages. The corresponding biplot (Figure 2) shows that the instrumental variables that loaded most positively in PC1 and consequently had most influence on sample differentiation were SSC, firmness and colour, which were higher for shorter shelf-life periods. Some aroma volatile compounds were also observed to have weight on sample differentiation along PC1. These were three acetate esters (pentyl acetate, hexyl acetate and 2-methylbutyl acetate) and two butanoate esters (butyl butanoate and pentyl butanoate), all of which showed higher concentrations for later shelf-life periods, with the exception of fruit from H2 that was kept for 28 days at 20 °C. This PCA model therefore demonstrated that aroma volatile emission is an important factor for defining fruit ripeness. Given the temporal association with the attainment of physiological maturity,

most of the aroma volatile compounds required to satisfy consumer. These samples and those harvested in H2 and kept for 21 days at 20 °C were therefore the ones most readily accepted by consumers.

On the graph, most of the aroma volatile compounds are situated on the left. Since they correlated strongly with samples from the ripe group, this seems to indicate that development stage has an important influence on aroma production.

The variables that positively influenced acceptability are shown in Figure 2 and they were: SSC, TA, firmness, epidermis colour (as standard quality parameters), sourness and firmness (as sensory attributes), and octyl acetate, hexyl octanoate, butyl propanoate, propyl pentanoate and 6-methyl-5-hepten-2-one (as volatile compounds). Results for 'Fuji' apples also suggested that SSC may be the best determinant of acceptability (Echeverria et al., 2004a). TA was also an aspect of taste quality that complimented SSC. Hampson et al. (2000) noted that perceived sourness was a better preference predictor than analytical measurements of titratable acidity, highlighting similar results to those presented in Figure 2, in which it was possible to observe that sourness and sensory firmness were close to acceptability. As far as aroma volatile compounds influencing acceptability is concerned, we should stress that octyl acetate, butyl propanoate and 6-methyl-5-hepten-2-one have respectively fruity (Burdock, 2002), apple (Plotto et al., 2000) and floral (Guillot et al., 2006) odour descriptors, with all of these odours being considered pleasant.

Relationship between Sensory and Instrumental Measurements

Figure 2 also shows correlations between different variables and a particularly high correlation between instrumental and sensory firmness was seen ($r=0.87$). These results differed from those obtained by Echeverria et al. (2004a) who worked with 'Fuji' apples and obtained low correlations between instrumentally measured firmness and its sensory perception. In contrast, our findings agreed with those reported by Harker et al. (2002a), who noted a positive relationship between penetrometer readings and sensory evaluations on several apple cultivars.

On the other hand, we noted a poor correlation between instrumentally measured TA values and sourness scores ($r=0.40$), although both variables were located within the positive quadrant of PC1 and PC2. Values for this parameter reported in the literature were also diverse, since SSC, the ratio of SSC/TA, and/or pH sometimes relate better to

sourness than to TA itself (Baldwin et al., 1998; Malundo et al., 2001). For instance, Blanpied and Blak (1977), who worked with other apple cultivars, obtained low correlations between instrumentally and sensorial determined acidity. However, Echeverría et al. (2004a) reported a positive relationship between TA readings for 'Fuji' apples and perceptions of sourness in the same fruit, while Harker et al. (2002b) reported that TA was the best predictor of an acidic taste. Furthermore, no correlation was found between instrumentally measured SSC values and consumer perceptions of sweetness. The sugars measured by the refractometer (SSC values expressed as percentage or °Brix) certainly contributed to sweetness. However, perceptions of sugar content can be masked or accentuated by the presence of acids and some aroma compounds that give sweet notes to the flavour (Malundo et al., 1995). This last finding could explain the excellent correlation between the perception of sweetness and certain aroma volatile compounds such as ethyl octanoate ($r=0.63$), ethyl butanoate ($r=0.81$), ethyl 2-methylbutanoate ($r=0.77$), butyl acetate ($r=0.84$), hexyl acetate ($r=0.83$), 2-methyl-1-butanol ($r=0.89$) and 2-methyl-1-propanol ($r=0.79$), some of which have been reported to contribute to the sensation of sweetness (Plotto et al., 2000). As predicted, the group of ripe fruit correlated negatively with TA and firmness values, confirming similar results reported by Echeverría et al. (2004a) and López et al. (2007) on 'Fuji' and 'Pink Lady' apples, respectively.

Due to the high correlation observed between instrumental and sensory firmness, we focused our interest on a detailed correlation analysis between them. A partial least square regression model (PLS1) was run in an attempt to correlate sensory firmness with instrumentally measured firmness. Figure 3 shows the predicted sensory firmness versus the measured firmness. This model revealed two sample groups associated to higher or lower sensory firmness. One group corresponded to H1 and H2 fruit kept at 20 °C for 0 or 7 days and H1 fruit kept for 14 days at 20 °C, which had the highest sensory firmness scores (labelled 'A' in the Figure 2). The second included H1 and H2 fruit kept at 20°C for 21 or 28 days and H2 fruit kept for 14 days at 20 °C, which had the lowest sensory firmness scores (labelled 'B'). The correlation coefficient between measured and predicted firmness was 0.87 and the RMSECV was 0.20 units of measure. These values showed the goodness of the firmness model.

To sum up, taking into account all the analysed variables it can be concluded that the optimum shelf-life period for 'Golden Reinders[®]' apples after ULO storage would be

between 7 and 14 days for both harvest dates. Fruit from this shelf-life window got a proper balance of volatile compounds, standard quality parameters upper than commercial requirements and satisfactory consumer acceptability.

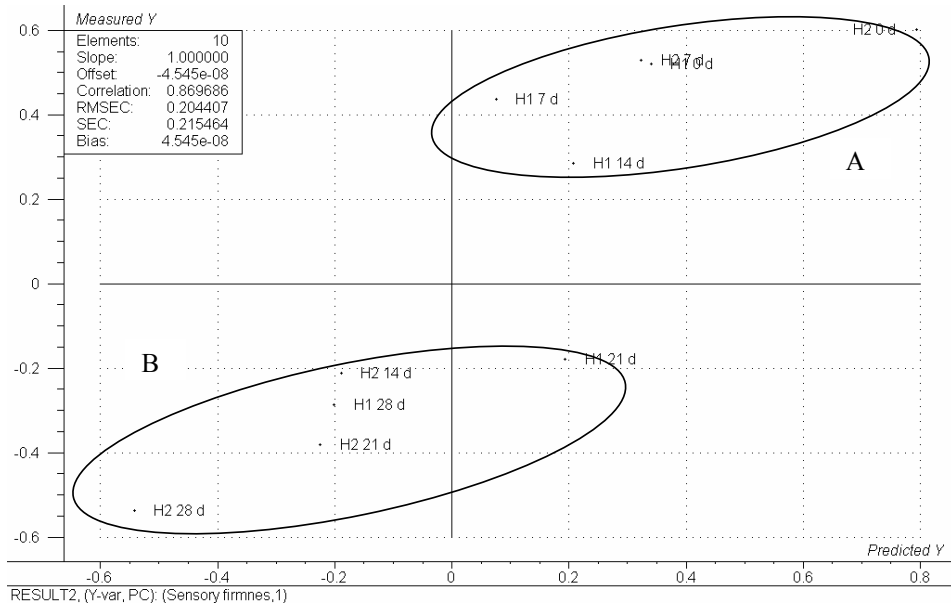


Figure 3. Predicted vs. measured plot corresponding to a PLSR model of sensory firmness (Y variable) vs. firmness (X variable) for 'Golden Reinders' apples at different shelf-life periods and for both harvest dates using full cross-validation. Samples were labelled as described in the 'Material and Methods' section.

4. Acknowledgements

R. Altisent is a recipient of a grant from Spain's Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). This work was supported through project RTA2005-00050-00-00 which was financed by INIA. The authors are indebted to Mrs. T. Miranda for technical assistance.

5. References

Anzaldúa-Morales A. 1994. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Spain: Acribia, pp. 181.

- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Einstein, M. A.; Malundo, T. M. M.; Carr, B. T.; Shewfelt, R. L.; Tandon, K. S.** 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavour. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 12, 906-915.
- Blanpied, G. D.; Blak, V. A.** 1977. A comparison of pressure tests, acid levels, and sensory evaluations of over-ripeness in apples. *HortScience*, 12, 73-74.
- Boylston T. D.; Kupferman, E. M.; Foss, J. D.; Buering, C.** 1994. Sensory quality of Gala apples as influenced by controlled and regular atmosphere storage. *Journal of Food Quality*, 17, 477-494.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavour Ingredients*, 4th ed. CRC Press.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G.; Teranishi, R.; Ling, L. C.** 1990. Tomato aroma components - identification of glycoside hydrolysis volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 2050-2053.
- Buttery, R. G.** 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits, In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*; Acree, T.E., Teranishi, R., Eds.; ACS Professional Reference Book: Washington; pp 259-286.
- CAMO ASA.** 1997. *Unscrambler Users Guide*, ver. 6.11a Programme Package for Multivariate Calibration, Trondheim, Norway.
- Crisosto, C. H.; Garner, D.; Doyle, J.; Day, K. R.** 1993. Relationship between fruit respiration, bruising susceptibility, and temperature in sweet cherries. *HortScience*, 28, 132-135.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Echeverria, G.; Lara, I.; Fuentes, T.; López, M. L.; Graell, J.; Puy J.** 2004a. Assessment of relationships between sensory and instrumental quality of controlled-atmosphere-stored 'Fuji' apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 6, 368-375.
- Echeverria, G.; Fuentes, M. T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004b. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of Fuji apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverria, G.; Fuentes, M. T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004c. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverria, G.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2008. Physicochemical measurements in 'Mondial Gala' apples stored at different atmospheres: influence on consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 135-144.
- Fazzalari, F. A.** 1978. *Compilation of odor and taste threshold values data*. ASTM Data Series DS 48A. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, U.S.A.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.

- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Guillot, S. ; Peytavi, L. ; Bureau, S. ; Boulanger, R. ; Lepoutre, J. P. ; Crouzet, J.; Schorr-Galindo, S.** 2006. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 96, 147-155.
- Hampson, C. R.; Quamme, H. A.; Hall, J. W.; MacDonaold, R. A.; King, M. C.; Cliff, M. A.** 2000. Sensory evaluation as a selection tool in apple breeding. *Euphytica*, 111, 79-90.
- Harker, F. R.; Maindonald, J. H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Hallet, I. C.; Walker, S. B.** 2002a. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Harker, F. R.; Marsh, K. B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002b. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Hoehn, E.; Gasser, F.; Guggenbühl, B.; Künsch, U.** 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 27-37.
- Iglesias, I.; Graell, J.; Echeverría, G.; Vendrell, M.** 2000. Orchard cooling with overtree sprinkler irrigation to improve fruit colour of 'Delicious' apples. *HortScience*, 35, 1207-1208.
- Kovats, E.** 1958. Gas chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. I. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41, 1915-1932.
- López, M. L.; Lavilla, J.; Graell, J.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Effect of different CA conditions on aroma and quality of Golden Delicious apples. *Journal of Food Quality*, 22, 583-597.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- López, M. L.; Villatoro, C.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; Echeverría, G.** 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady[®]' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 55-66.
- Malundo, T. M. M.; Shewfelt, R. L.; Ware, G. O.; Baldwin, E. A.** 2001. Sugars and acids influence flavor properties of mango (*Mangifera indica*). *Journal of American Society of Horticultural Science*, 126, 115-121.

- Martens, H.; Naes, T.** 1989. Partial least squares regression. In *Multivariate Calibration*; Wiley, J. and Sons, Eds.; Chichester, U.K.; pp 116-165.
- Mattheis, J. P.; Fellman, J. K.; Chen, P. M.; Patterson, M.** 1991. Changes in headspace volatiles during physiological development of Bisbee Delicious apple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1903-1906.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 194-199.
- Plotto, A.; Azarenko, A. N.; Mattheis, J. P.; McDaniel, M. R.** 1995. 'Gala', 'Braeburn', and 'Fuji' apples: Maturity Indices and Quality after Storage. *Fruit Varieties Journal*, 49, 133-142.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 125, 714-722.
- Poole, C. L.; Poole, S. K.** 1993. The Column in Gas Chromatography. In *Chromatography Today*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp 176-181.
- Rizzolo, A.; Grassi, M.; Zerbini, P. E.** 2006. Influence of postharvest ripening on changes in quality and volatile compounds of 'Golden Orange' and 'Golden Lasa' scab-resistant apple cultivars. *Journal of Food Quality*, 29, 353-373.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W.** 1998. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Hrsg.
- Saftner, R. A.; Abbott, J. A.; Conway, W. S.; Barden, C. L.; Vinyard, B. T.** 2002. Instrumental and sensory quality characteristics of 'Gala' apples in response to prestorage heat, controlled atmosphere, and air storage. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 127, 1006-1012.
- SAS.** 1988. *Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics*. 6th ed.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schnabel, K. O.; Belitz, H. D.; Von Ranson, C.** 1988. Investigations on the structure-activity relationships of odorous substances. Part 1. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen functions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung. A*, 187, 215-223.
- Stow, J.** 1995. Quality measurements of apples. *Postharvest News and Information*, 6, 32-33.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 471-477.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.** 1992. Volatile constituents of Asian Pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1925-1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ling, L.** 1996. Odour thresholds of various branched and straight chain

acetates. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 677-680.

Van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. H. 1997. *Compilation of odour threshold values in air and water*. National Institute for Water Supply, Voorburg, The Netherlands.

Wills, R. B. H.; Lee, T. H.; Graham, D.; McGlasson, W. B.; Hall, E. G. 1997. *Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables*. 4th Edition. New South Wales University Press, New South Wales, Australia. pp.174

Discusión general



7. DISCUSIÓN GENERAL

En base a los antecedentes científicos existentes sobre la temática objeto de estudio en la presente Tesis, y a los resultados experimentales obtenidos en la misma a continuación se hace una discusión global sobre el conjunto de conocimientos obtenidos.

7. 1. Emisión de compuestos volátiles.

- *En cosecha*

El perfil aromático de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ estuvo constituido por 34 compuestos volátiles (26 ésteres y 8 alcoholes), en la primera campaña, y 36 compuestos (27 ésteres y 9 alcoholes), en la segunda. Las concentraciones de dichos compuestos fueron variables dependiendo del año y de la fecha de cosecha, hecho que ya ha sido expuesto previamente en otros trabajos, en los cuales se establece que la concentración en la que se encuentran dichos compuestos es dependiente de distintos factores precosecha así como del año (Dirinck y Schamp, 1989; Song y Bangerth, 1994; López y col., 1998a; Echeverría y col., 2004a).

Cuantitativamente, los compuestos más importantes fueron el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo, el 2-metilbutanoato de hexilo, el hexanoato de butilo y el butanoato de hexilo. Estos compuestos juntos constituyeron entre el 62% y 64% del aroma total dependiendo del año y de la fecha de cosecha. La importancia de los ésteres como compuestos que más contribuyen al aroma en manzanas, también ha sido observada en otras variedades como ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Pink Lady[®]’, ‘Mondial Gala[®]’ y ‘Starking Delicious’ (López y col., 1998a, b; Lavilla y col., 1999; Lara y col., 2007; Villatoro y col., 2009).

La relevancia encontrada del acetato de 2-metilbutilo como compuesto principal del perfil aromático de manzanas ‘Fuji’, coincide con resultados obtenidos en esta misma variedad por Echeverría y col. (2004a) y Fellman y col. (2000), así como en ‘Bisbe Delicious’ (Mattheis y col., 1991); estos autores recomiendan este compuesto como indicador no destructivo de la madurez de los frutos para la estimación de la fecha de recolección óptima. En este sentido, sería interesante comprobar el grado de detección de dicho compuesto por parte de instrumentos como “narices electrónicas” que se están desarrollando en los últimos años para ser utilizados en la estimación del estado de madurez en manzanas y otros frutos (Young y col., 1999). A nivel de

biosíntesis, se ha propuesto que el acetato de 2-metilbutilo proviene de la L-isoleucina via 2-metil-1-butanol (Wyllie y Fellman, 2000), y de hecho, en nuestras investigaciones hemos comprobado que la emisión de acetato de 2-metilbutilo es coincidente con la de su alcohol precursor 2-metil-1-butanol, que fue el predominante en cosecha. Así, Matich y Rowan (2007) observaron que la adición de 2-metil-1-butanol provocaba un aumento en el acetato de 2-metilbutilo. Otros alcoholes importantes cuantitativamente que siguen al 2-metil-1-butanol son el 1-hexanol y el 1-butanol, cuya concentración también estuvo respectivamente correlacionada con la de los acetatos de hexilo y de butilo, ésteres que también han sido predominantes en el perfil aromático de esta variedad. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Echeverría y col. (2004a).

Con relación al efecto de la campaña, se observó que los frutos de la primera campaña presentaban más concentración total de compuestos volátiles ($808,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) que los correspondientes a la segunda campaña ($495,3 \mu\text{g kg}^{-1}$). Ya que los tratamientos precosecha fueron los mismos, se sugiere que existen otros factores tanto externos (climáticos) como internos (metabolismo del fruto relacionado con la maduración) juegan un papel importante en la regulación de compuestos volátiles (Yamada y col., 1994; Mattheis y col., 1995; Motosugi y col., 1995). Para comprobar el factor climático se registraron las temperaturas máximas y mínimas en los tres meses anteriores a la cosecha para ambas campañas. De los resultados se pudo extraer que el segundo año (2006) fue más cálido que el primero (2005). Otros autores, también para la variedad 'Fuji', han demostrado que los frutos procedentes de lugares fríos presentaban un mayor contenido de ésteres en el momento de la cosecha mientras que aquellos procedentes de lugares más cálidos presentaban menor emisión en cosecha, si bien ésta aumentaba después del almacenamiento en atmósfera controlada (Fellman y col., 1997). La menor emisión en la segunda campaña (temperaturas más elevadas) corrobora los resultados anteriores. Ahora bien, a nivel de compuestos individuales no existieron, en general, diferencias significativas en la concentración de aquellos compuestos que se consideran característicos de la variedad, a excepción del butanoato de etilo y el 2-metilbutanoato de hexilo (que presentaron menor concentración en la segunda campaña). Trabajos anteriores realizados en la misma zona y con frutos de la misma variedad también demostraron que existen diferencias en la composición total de volátiles para dos campañas distintas, en el momento de cosecha (Echeverría y col., 2004a).

En cuanto al efecto de la fecha de cosecha, no se observaron diferencias en la producción de etanol entre las manzanas cosechadas más tardíamente y aquellas cosechadas más tempranamente, contrariamente a resultados encontrados en manzanas ‘Gala’ por Fellman y col. (2000), los cuales detectaron una menor producción de dicho compuesto en frutos cosechados más tardíamente. Sin embargo, sí que se observó un efecto positivo del retraso en la fecha de cosecha en la mayoría de los compuestos volátiles emitidos, cuyas concentraciones fueron más altas en manzanas cosechadas más tardíamente, excepto para el acetato de metilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de hexilo, el hexanoato de 2-metilpropilo, el 1-propanol, el 1-pentanol, el 1-hexanol y el 2-etil-1-hexanol. Ello sería atribuible a que los frutos de la segunda cosecha (11 días después de la cosecha comercial) presentaban en el momento de la recolección un estado de madurez más avanzado, tal como indican los valores de sus índices de madurez (elevado índice de almidón y bajos valores de firmeza). Echeverría y col. (2002) también obtuvieron diferencias significativas en la cantidad total de volátiles correspondientes a frutos de dos fechas distintas de recolección. Otros trabajos han demostrado, para la misma variedad, que el contenido de ésteres del grupo acetato aumentaba a lo largo de la maduración en campo (Fellman y col., 2000; Echeverría y col., 2004b). Varios autores han constatado que el aroma aumenta con la maduración y que, a su vez, ello está asociado con la producción de etileno (Song y Bangerth, 1996; Lalel y col., 2003; Defilippi y col., 2004). De todas maneras, las manzanas ‘Fuji’ presentan una evolución más lenta de los parámetros de madurez (entre ellos, el aroma) que en el caso de otras variedades; este comportamiento guardaría relación con una más baja producción de etileno, típica de esta variedad (Jobling y McGlasson, 1995; Fellman y col., 1997).

La contribución de un compuesto al aroma de un fruto depende de su concentración así como de su umbral de percepción olfativa (Baldwin y col., 2000). Así pues, aquellos compuestos que presenten un valor positivo del logaritmo de la unidad de olor (concentración de un compuesto dividida por su umbral olfativo) podemos considerar que contribuyen al aroma. Por consiguiente, en la presente Tesis podemos deducir que el butanoato de etilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo contribuyen, en cosecha, al aroma de manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’. Sin embargo, incluso los compuestos con los valores negativos de unidades de olor pueden contribuir al sabor global de

manzana aportando las denominadas “notas de fondo”. En trabajos anteriores referidos a la misma variedad, el butanoato de etilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo fueron considerados los compuestos que más contribuyeron al aroma característico de estas manzanas en el momento de cosecha (Echeverría y col., 2004a; Lara y col., 2006). Estos compuestos contribuyen a las notas aromáticas “verde-fresco” y “afrutado” (Flath y col., 1967; Dimick y Hoskin, 1983; Rizzolo y col., 1989; Young y col., 1996).

Por otro lado, en el caso de la variedad ‘Golden Reinders®’, el perfil aromático para las dos campañas estudiadas, estuvo formado por 37 compuestos volátiles (29 ésteres y 8 alcoholes). Entre los compuestos de mayor importancia cuantitativa cabe resaltar los ésteres: acetato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo, acetato de 2-metilbutilo, acetato de hexilo y 2-metilbutanoato de hexilo, los cuales representaron entre un 44 y un 50% de la concentración total de volátiles (dependiendo del año y de la fecha de cosecha). Alguno de estos ésteres también fueron considerados importantes en un estudio realizado por López y col. (2000) con manzanas ‘Golden Delicious’, en el que se detectó que los principales ésteres en cosecha fueron el acetato de etilo, el propanoato de etilo, el acetato de propilo, el acetato de 2-metilpropilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de butilo y el acetato de 2-metilbutilo. Basándonos en sus unidades de olor, nuestros resultados permiten inferir que los compuestos que se pueden considerar característicos de la variedad serían el 2-metilbutanoato de etilo, el acetato de 2-metilbutilo, el 2-metilbutanoato de butilo, el hexanoato de etilo, el acetato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio realizado por Rizzolo y col. (2006) con manzanas ‘Golden Delicious’. En la misma zona, y también para la variedad ‘Golden Delicious’, López y col. (2000) demostraron la importancia del 2-metilbutanoato de etilo y del acetato de 2-metilbutilo. Existen otros trabajos que también destacan al acetato de butilo y al acetato de hexilo como los compuestos dominantes en el perfil de ‘Golden Delicious’, representando los mismos un 60% del total de compuestos volátiles (Song y Bangerth, 1996).

Las distintas variedades de manzana se pueden agrupar de acuerdo con el tipo de ésteres mayoritarios; así, manzanas verde-amarillentas (como ‘Golden Delicious’) son consideradas manzanas de tipo ‘acetato’, mientras que las variedades rojas (del grupo ‘Delicious’ y otros) son consideradas más del tipo ‘butanoato’ (Rizzolo y col., 2006).

En el caso de las dos variedades objeto de estudio en la presente Tesis este comportamiento diferencial no se ha evidenciado de forma tan clara.

Referente a la influencia de la campaña sobre la emisión de compuestos volátiles en frutos de la variedad ‘Golden Reinders’[®], se observó que, aunque los índices de madurez en cosecha eran similares, los frutos correspondientes a la segunda campaña presentaron una emisión total significativamente superior ($797,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) a la observada en los frutos de primera campaña ($256,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Este efecto de la campaña también fue observado por López y col. (1998a) con la variedad ‘Golden Delicious’. En nuestro caso, también se observó un efecto diferencial del año sobre la concentración de los ésteres: 2-metilbutanoato de etilo y 2-metilbutanoato de hexilo, siendo sus concentraciones superiores en la segunda campaña. Tal como se ha comentado previamente, ello guardaría relación con el hecho de que la climatología del periodo precosecha en el año 2007 se caracterizó por temperaturas más bajas que el año 2006.

Con relación al efecto de la fecha de cosecha sobre la producción total de compuestos volátiles de las manzanas ‘Golden Reinders’[®], no se observaron diferencias significativas entre los frutos recolectados tempranamente ($256,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) y tardíamente ($388,3 \mu\text{g kg}^{-1}$), aunque sí que existieron diferencias significativas en cuanto a los parámetros físicoquímicos de madurez de dichos frutos. Tampoco se observó una influencia de la fecha de cosecha sobre aquellos compuestos considerados característicos de esta variedad. Estos resultados no coinciden con otros obtenidos en manzanas ‘Golden Delicious’, los cuales demostraron que la fecha de cosecha afectaba a la acumulación de volátiles, en el sentido de que los frutos procedentes de una cosecha precoz o comercial mostraban un mayor contenido de ésteres mientras que aquellos frutos recolectados más tardíamente eran más ricos en alcoholes (Fernandino y col., 2001). Este resultado podría ser debido a que el periodo de tiempo transcurrido entre ambas cosechas (8 días) fuese demasiado corto en la presente Tesis. Otros autores han observado diferencias significativas en la emisión de compuestos volátiles en manzanas ‘Golden Delicious’ cuando las cosechas analizadas distaban entre sí entre 13 y 41 días (Song y Bangerth, 1996). En manzanas ‘Gala’ sí que se obtuvo un aumento en la concentración de compuestos volátiles entre cosechas que distaban 12 días (Moya-León y col., 2007); puede suponerse que ello guarda relación con el comportamiento típico de la variedad ‘Gala’, cuyos frutos muestran un rápido y corto climaterio durante su maduración.

- *En almacenamiento frigorífico y posterior vida comercial.*

La tecnología de almacenamiento tiene gran influencia en la producción de compuestos volátiles. En este sentido, las atmósferas controladas, que son beneficiosas para mantener la calidad y reducir ciertos desórdenes (Brackmann y col., 1994; Graell y col., 1997) provocan una modificación y/o disminución del aroma. Varios estudios demuestran que las atmósferas controladas (especialmente en el caso de atmósferas con bajo nivel de oxígeno) provocan, en general, una reducción en la producción total de compuestos volátiles en manzanas (Mattheis y col., 1995; Fellman y col., 2000, 2003; López y col., 2000; Plotto y col., 2000; Argenta y col., 2004; Echeverría y col., 2004b). En general, concentraciones más bajas de oxígeno y/o más altas de dióxido de carbono, junto con periodos largos de almacenamiento, provocan una mayor disminución de compuestos volátiles. En la presente Tesis, se observó también que la atmósfera ULO disminuyó la concentración de volátiles después de conservación, con respecto a frutos conservados en condiciones de frío normal (datos no mostrados).

El perfil aromático de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ tras la frigoconservación estuvo caracterizado por 46 compuestos volátiles de los cuales 36 eran ésteres (23 lineales y 13 ramificados) y 10 alcoholes. Así pues, después del almacenamiento frigorífico, se detectaron 10 ésteres más que en cosecha; estos compuestos fueron el butanoato de metilo, el butanoato de 2-metilpropilo, el 2-metilpropanoato de 2-metilbutilo, el propanoato de pentilo, el hexanoato de etilo, el octanoato de etilo, el octanoato de butilo y el octanoato de hexilo. Este aumento en el número de volátiles así como de su concentración, a la salida de cámara, fue observado también en el caso de manzanas ‘Golden Delicious’ (López y col., 2000), ‘Fuji’ (Echeverría y col., 2004a) y ‘Pink Lady[®]’ (Villatoro y col., 2009).

Las atmósferas con un periodo adicional en frío provocaron un aumento en la concentración total de compuestos volátiles con respecto a aquellos frutos conservados en condiciones ULO aunque este aumento no siempre fue significativo. En general, no existieron diferencias en cuanto a los distintos periodos de conservación (19 y 30 semanas) y/o periodos de permanencia a 20 °C (1 y 7 días). De forma específica, la conservación de frutos en condiciones ULO+2s y ULO+4s causó un aumento en los siguientes compuestos: acetato de propilo, acetato de butilo, acetato de pentilo, acetato de hexilo, propanoato de butilo, butanoato de etilo, butanoato de butilo, hexanoato de etilo, hexanoato de butilo, hexanoato de pentilo, acetato de 2-metilpropilo, acetato de 2-

metilbutilo, 2-metilpropanoato de butilo, propanoato de 2-metilbutilo, y 2-metilbutanoato de hexilo, además de los alcoholes: 1-propanol, 1-butanol y 2-heptanol. Entre los compuestos anteriormente citados, cabe resaltar tanto cuantitativa como cualitativamente (por presentar un valor positivo del logaritmo de la unidad de olor) a los ésteres: acetato de 2-metilbutilo, 2-metilbutanoato de hexilo, acetato de hexilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo y propanoato de 2-metilbutilo. La concentración de estos compuestos se vió aumentada por las condiciones de almacenamiento ULO+4s, e incluso, algunos de ellos se detectaron *de novo*, puesto que no eran detectados tras la salida inmediata de la cámara ULO (butanoato de etilo y hexanoato de etilo). Todos estos compuestos le confieren al aroma de estas manzanas una mayor intensidad “frutal”, “dulce” y “fresca” (Dimick y Hoskin, 1983; Rizzolo y col., 1989; Burdock, 2000). Detallando un poco más su contribución al aroma cabe resaltar que el acetato de hexilo es el compuesto que más contribuye al atributo “afrutado” y “a pera” (Plotto y col., 1999). El 2-metilbutanoato de butilo y el 2-metilbutanoato de hexilo aportan un aroma “a manzana” y “afrutado” (Plotto y col., 2000; Fuhrmann y Grosch, 2002). La importancia, por su efecto sobre el sabor, del acetato de 2-metilbutilo, del acetato de butilo, del acetato de hexilo y del butanol también fue encontrada por otros autores en el caso de la variedad ‘Royal Gala[®]’ (Plotto y col., 1999; Saftner y col., 2002; Moya-León y col., 2007).

A partir de la comparación entre campañas, se observó que los frutos ‘Fuji Kiku[®] 8’ de la segunda campaña presentaban una concentración de volátiles mayor que los frutos de la primera campaña, para ambos periodos de almacenamiento frigorífico ensayados (19 y 30 semanas). Estos resultados coinciden con otros autores en la zona (Echeverría y col., 2004a) quienes detectaron una mayor emisión de compuestos volátiles (ocho veces mayor) en una campaña con respecto a la anterior. Se conoce que las condiciones reinantes durante la fase precosecha ejercen un papel muy importante en el desarrollo de aromas en manzanas. Tal como se ha mencionado anteriormente en el momento de la cosecha, el año 2006 (segunda campaña) fue más caluroso que el año anterior y, por tanto, se esperaba una mayor emisión de compuestos a salida de conservación, como resaltaron Fellman y col. (1997) para la misma variedad. Sin embargo, a pesar de estas diferencias cuantitativas en la producción total de compuestos volátiles, cabe señalar como un resultado muy positivo que los compuestos que

aumentaron su concentración debido al almacenamiento en condiciones ULO+2s y ULO+4s fuesen los mismos en ambas campañas.

Si analizamos el posible efecto de recolectar los frutos en un estado de madurez más avanzado (diferiendo las cosechas en 11 días) sobre la regeneración de compuestos volátiles tras la frigoconservación, se observa que para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, no existieron diferencias significativas entre el contenido total de compuestos presentes en los frutos correspondientes a ambas fechas de recolección. Posiblemente, esto fue debido a que un retraso de 11 días en cosechar los frutos (con respecto a la primera recolección) no fue suficiente para provocar cambios marcados en su estado de madurez tras la frigoconservación. De hecho, se conoce que ‘Fuji’ es una variedad con una pauta de maduración ‘casi no climatérica’, que se traduce en pequeños cambios en los parámetros de madurez a lo largo de su permanencia en árbol así como a lo largo de la posterior conservación frigorífica (Fan y col., 1997). Aún así, estudios previos referidos a la misma variedad detectaron diferencias significativas a causa de fechas de recolección distintas (185 y 195 ddpf) (Echeverría y col., 2004a), poniendo ello de relieve que existe una gran diversidad de factores que pueden interaccionar y matizar los resultados de un estudio en comparación a otro (tipo de clon, climatología de la campaña, características de la plantación, etc.).

Para la variedad ‘Golden Reinders[®]’ el perfil aromático a la salida de cámara estuvo formado por 42 compuestos volátiles de los cuales 33 fueron ésteres (21 lineales y 12 ramificados) y 9 alcoholes. Después de la conservación frigorífica se detectaron 5 compuestos más que en cosecha: el propanoato de *t*-butilo, el propanoato de propilo, el propanoato de 2-metilpropilo, el 2-metilbutanoato de 2-metilbutilo y el 2-heptanol. Con relación al contenido total en compuestos volátiles en ‘Golden Reinders[®]’, se observó que las condiciones de almacenamiento que implicaban un periodo adicional en frío provocaron un aumento con respecto a las condiciones ULO; estas diferencias se evidenciaban al cabo de 7 días de permanencia a 20°C pero no se observaron a tan sólo 1 día de vida comercial. Específicamente, después de 19 semanas, las condiciones ULO+4s fueron las más efectivas, mientras que para largos almacenamientos (30 semanas) se evidenciaban ya beneficios con ULO+2s. Además, si comparamos las diferencias entre los periodos de permanencia a 20°C, la producción de volátiles fue mayor tras 7 días. Este resultado es importante desde el punto de vista de calidad de consumo, si tenemos en cuenta que éste es el periodo medio de vida comercial, es decir

el tiempo estimado de llegada del fruto al consumidor desde su salida de la cámara frigorífica. Esta recuperación gracias a un periodo adicional en frío no se ha observado en la variedad 'Pacific Rose[®]', cuyos frutos incluso siguieron mostrando un descenso en el contenido de volátiles durante la permanencia a 20 °C posterior al almacenamiento (Tough y Hewett, 2001). Yahia (1991) indicó que un periodo adicional de 3 semanas a 3,3 °C después del almacenamiento en AC tampoco mejoraba la síntesis de volátiles. Otros trabajos han demostrado que el tiempo necesario para regenerar el aroma a la salida de cámara hasta cierto nivel disminuye cuanto más avanzado es el estado de madurez del fruto (Fellman y col., 2003).

El efecto de las condiciones de almacenamiento fue muy parecido en ambas campañas. Para cortos periodos de conservación (19 semanas), las condiciones ULO+4s fueron las más efectivas, aunque en la primera campaña no hubo diferencias con respecto a ULO+2s. Después de largos periodos de almacenamiento (30 semanas), las condiciones ULO+2s provocaban un aumento en la concentración de volátiles, y, en cambio, se produjo una disminución para aquellos frutos sometidos a condiciones ULO+4s. Los compuestos que se regeneraron en ambas campañas en frutos conservados con las atmósferas ULO+2s y/o ULO+4s fueron un total de 26: acetato de propilo, acetato de 2-metilpropilo, acetato de butilo, propanoato de 2-metilpropilo, 2-metil-1-propanol, acetato de 2-metilbutilo, 1-butanol, propanoato de butilo, 2-metilpropanoato de butilo, acetato de pentilo, propanoato de 2-metilbutilo, butanoato de butilo, 2-metilbutanoato de butilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, 2-metilbutanoato de 2-metilbutilo, hexanoato de propilo, propanoato de hexilo, 1-hexanol, hexanoato de 2-metilpropilo, hexanoato de butilo, butanoato de hexilo, 2-metilbutanoato de hexilo, hexanoato de pentilo, hexanoato de hexilo y octanoato de butilo. Entre dichos compuestos, el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el 2-metilbutanoato de butilo, el hexanoato de etilo, el acetato de hexilo, el propanoato de hexilo y el 2-metilbutanoato de hexilo presentaron un valor positivo del logaritmo de la unidad de olor, y son por tanto compuestos que pueden ser considerados como característicos del sabor de esta variedad. La importancia de algunos de estos ésteres ha sido resaltada en otros trabajos, como el de Rizzolo y col. (2006), quienes observaron que el 2-metilbutanoato de etilo y hexilo y el acetato de hexilo y 2-metilbutilo contribuían específicamente al aroma característico de las manzanas del grupo 'Golden'. Además, se conoce que el alcohol 1-hexanol así como sus ésteres

correspondientes, contribuyen significativamente a las notas ‘verdes’ en el aroma (Olías y col., 1993).

Si bien el comportamiento de las manzanas ‘Golden Reinders®’ fue similar en los dos años estudiados, en la primera campaña la emisión total de compuestos volátiles fue significativamente superior para ambos periodos de conservación. Además, en la primera campaña existieron diferencias a causa de los diferentes periodos de conservación mientras que en la segunda no las hubo. Cabe remarcar que si bien hubo diferencias cuantitativas entre campañas, en ambas se observó la regeneración de los mismos compuestos. Otros autores han resaltado que el factor año es importante (Mattheis y Fellman, 1992; Mattheis y col., 1995; López y col., 1998a; Echeverría y col., 2004a). En nuestro caso, en la variedad ‘Golden Reinders®’, cabe remarcar que del total de los ésteres regenerados en ambas campañas, un 61% fueron ésteres de cadena lineal. Estos ésteres son los considerados característicos de la variedad ‘Golden Delicious’, y diferentes autores consideran al acetato de butilo y al acetato de hexilo como predominantes en esta variedad (Smith, 1984; Dirinck y Schamp, 1989; Poll y Hansen, 1990; Olías y col., 1992; Brackmann y col., 1993; Song y Bangerth, 1994). Además, López y col. (1998a) destacaron también el propanoato de etilo, el acetato de etilo y el acetato de propilo, en la citada variedad de manzana.

Analizando el efecto de las dos fechas de recolección en la variedad ‘Golden Reinders®’, se observaron diferencias significativas, pero sólo para largos periodos de conservación y para los tratamientos ULO y ULO+2s, en los que los frutos de cosecha comercial presentaron una concentración mayor de volátiles que aquellos procedentes de una cosecha más tardía. Para los frutos de ambas cosechas, se observó un comportamiento muy similar en respuesta a los distintos factores poscosecha analizados (condiciones de almacenamiento, periodo de almacenamiento, periodo de permanencia a 20 °C) a excepción de aquellos frutos conservados durante 30 semanas y madurados durante 7 días a 20 °C, en los que, para la cosecha comercial, el almacenamiento en ULO+2s fue mejor que en ULO; para aquellos frutos correspondientes a la cosecha más tardía fue el tratamiento ULO+4s el que permitió la obtención de una mayor concentración de volátiles. También, en otros estudios se han observado diferencias significativas a salida de la cámara de almacenamiento, para manzanas ‘Golden Delicious’, a causa de las distintas fechas de recolección (Ferrandino y col., 2001; Song y Bangerth, 2003; Rizzolo y col., 2006).

De acuerdo con los objetivos planteados en la presente Tesis, también se ha estudiado en la misma la evolución de los compuestos volátiles de las manzanas ‘Golden Reinders[®]’, recolectadas en dos fechas distintas, a lo largo de distintos periodos de permanencia a 20 °C (0, 7, 14, 21 y 28 días) después de su almacenamiento en cámara frigorífica. La finalidad de este estudio es poder estimar la “vida útil” del fruto, desde su expedición en cámara hasta el momento en que se mantiene una calidad satisfactoria para su consumo. A partir de los resultados obtenidos, se observó que, para frutos procedentes de la cosecha comercial, la mayoría de compuestos volátiles (68,4%) mostraron un aumento progresivo en su concentración a lo largo del periodo de permanencia a 20 °C, llegando a un máximo al cabo de 28 días. Este aumento de los ésteres durante la maduración de manzanas después de su almacenamiento también fue observado por otros autores (Fellman y col., 2000). En cambio, en aquellos frutos procedentes de una cosecha más tardía, un 71 % de los compuestos volátiles experimentaban un aumento en su concentración hasta los 21 días de permanencia a 20 °C, dándose posteriormente un descenso hasta los 28 días. Así, de nuestros resultados podemos concluir que con una madurez más avanzada en cosecha, el tiempo necesario para aumentar la concentración de volátiles a la salida de conservación es menor. Este mismo comportamiento fue observado por otros autores en manzanas del grupo ‘Delicious’ (Fellman y col., 2003). Otros estudios previos demostraron que el número de ésteres aumentaron significativamente durante 10-14 días de maduración a 20 °C para manzanas ‘Bisbe Delicious’ (Mattheis y col., 1995), ‘Royal Gala[®]’ (Young y col., 2004), ‘Jonagold’ (Róth y col., 2007) y ‘Pink Lady[®]’ (Villatoro, 2008b).

Si analizamos comparativamente la evolución del perfil aromático de ambas variedades con relación al efecto ejercido por el periodo adicional en frío normal tras la conservación en ULO observamos que fue muy similar, aunque con ciertos matices diferenciales. En las dos variedades se observa que los ésteres regenerados fueron en gran parte los mismos, aunque se consiguió la regeneración de un mayor número de compuestos para la variedad ‘Golden Reinders[®]’. De los regenerados en ‘Fuji Kiku[®] 8’ se observó que 9 fueron ésteres de cadena lineal y 6 de cadena ramificada, mientras que en el caso de ‘Golden Reinders[®]’, 14 fueron de cadena lineal y 9 de cadena ramificada. Por tanto, en ambas variedades fue mayor el aumento de los ésteres de cadena lineal. En este sentido Young y col. (2004) y Fellman y col. (2003) demostraron que los ésteres de bajo peso molecular aumentaban más rápidamente a la salida de almacenamiento en AC

que los ésteres de mayor peso molecular. Varios estudios demostraron que las atmósferas con niveles de oxígeno entre 1% y 2,5% y niveles de dióxido de carbono entre 2% y 3% provocan una mayor disminución de los ésteres de cadena lineal que los ésteres de cadena ramificada ((Streif y Bangerth, 1988; Brackmann y col., 1993; Mattheis y col., 1995; López y col., 1998b; Harb y col., 2000; Argenta y col., 2004; Mattheis y col., 2005; Lara y col., 2006; 2007). En cuanto a la emisión de alcoholes, en la presente Tesis hemos observado un aumento en la concentración de algunos de ellos debido a la permanencia del fruto en frío durante un periodo adicional, tal como en el caso del 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-butanol, 1-hexanol y 2-heptanol. Hay estudios en los que se encontró que concentraciones de oxígeno durante el almacenamiento inferiores a 0,5% provocaron un aumento en la concentración de alcoholes debido a condiciones anaeróbicas (Mattheis y col., 1991; Dixon y Hewett, 2001), mientras que otras concentraciones alrededor de 1,5 % no provocaron ningún aumento (Moya-León y col., 2007). En nuestra situación en la que usamos niveles de oxígeno similares (1%) el aumento de alcoholes tras el almacenamiento en condiciones ULO+2s y ULO+4s podría haber sido causado por la reactivación de la enzima LOX (cuya actividad precisa de oxígeno) provocando ello la conversión de ácidos grasos a los alcoholes precursores de los ésteres.

En general, podemos concluir que un periodo adicional de 2 semanas en frío no ha sido suficiente para aumentar la concentración de algunos compuestos volátiles en la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’. Esto puede ser debido a que las atmósferas controladas tienen un “efecto residual” sobre la producción de volátiles y los frutos necesiten más tiempo para reactivar su metabolismo (Plotto y col., 1999). Una baja producción de etileno también sería una causa de este “efecto residual”, puesto que se ha observado que una exposición de manzanas al etileno externo origina una mayor producción tanto de ésteres como de alcoholes (Mattheis y col., 2005). De ahí que podemos suponer que en el caso de las manzanas ‘Fuji’ (conocidas por su baja producción de etileno), un periodo adicional de 2 semanas no sea suficiente para reactivar el metabolismo del fruto, mientras que en el caso de la variedad ‘Golden Reinders’ (caracterizada por una mayor producción de etileno), un periodo adicional de 2 semanas sea suficiente para producir un aumento en su concentración.

Un estudio en manzanas ‘Gala’ almacenadas en condiciones 1% O₂:1% CO₂ durante 16 semanas con un periodo adicional de 4 semanas en frío mostró un aumento

en la concentración total de ésteres con respecto al almacenamiento durante 20 semanas en condiciones ULO; además, estos frutos también presentaban un aumento del aroma (medido sensorialmente) y de la intensidad de los atributos “floral” y “afrutado” (Plotto y col. 1999). Un efecto similar se encontró en otros trabajos con distintas variedades de manzana, tales como: ‘Jonagold’ (Hansen y col., 1992), ‘Delicious’ (Fellman y col., 2003), ‘Royal Gala’ (Young y col., 2004) y ‘Pink Lady[®]’ (Villatoro y col., 2008b).

Entre los compuestos que se han regenerado después del almacenamiento, cabe destacar que el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo y el acetato de hexilo son considerados los mayores contribuyentes al aroma característico “a manzana” en la mayoría de variedades (Fellman y col., 2000). Así, en el caso de la variedad ‘Pinova’ estos compuestos representaron el 90% del total de ésteres (Raffo y col., 2009). Además, es importante resaltar que, en las variedades ‘Golden Delicious’, ‘Fuji’ y ‘Braeburn’, el acetato de butilo, el acetato de 2-metilbutilo, el acetato de 2-metilpropilo, el acetato de hexilo, el propanoato de butilo, el butanoato de butilo, el butanoato de 2-metilbutilo, el 1-hexanol y el 1-hexanal han sido reconocidos como los principales compuestos que contribuyen al olor del fruto (Mehinagic y col., 2006). Otros autores han pronosticado que cambios en la cantidad de los acetatos de butilo y hexilo van a reflejar la tendencia del total de compuestos detectados (Raffo y col., 2009). En manzanas ‘Golden Delicious’ la adición de 1-butanol causó un aumento del acetato de butilo, butanoato de butilo, 2-metilbutanoato de butilo y acetato de propilo, mientras que disminuyó la concentración del acetato de hexilo; esto sería debido a que el aumento en la síntesis de acetato de butilo fue tan grande (130%) que consumió el grupo acetato, no quedando éste disponible para la síntesis del acetato de hexilo (Harb y col., 2000). Plotto y col. (2000) demostraron que manzanas almacenadas durante 16 semanas en ULO y 4 semanas en frío estaban caracterizadas por un aroma más intenso a “manzana” que procedía de los compuestos 2-metilbutanoato de butilo y de hexilo, y del propanoato de hexilo así como una intensidad “a sandía” y “a champiñón” que procedían de compuestos desconocidos.

Para entender desde un punto de vista bioquímico la evolución de los compuestos volátiles emitidos por las manzanas (para las dos variedades estudiadas) después de su almacenamiento en las diferentes condiciones atmosféricas ensayadas (ULO y ULO más un periodo adicional en frío), se analizó con detalle la actividad de las enzimas lipoxigenasa (LOX) e hidroperóxido liasa (HPL). Varios autores han demostrado la

importancia de las enzimas localizadas en la parte superior de la ruta biosintética de la lipoxigenasa, más arriba de la actividad AAT, como enzimas clave en la formación de volátiles (Dixon y Hewett, 2000; Wyllie y Fellman, 2000). La actividad de la enzima LOX, que cataliza la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados, ha sido propuesta como esencial para la recuperación de la capacidad para sintetizar ésteres volátiles después del almacenamiento en AC, tanto en manzanas (Lara y col., 2006, 2007) como en peras (Lara y col., 2003). Cambios en las actividades de LOX y HPL durante la maduración de los frutos confirman la relación entre estas actividades enzimáticas y el sabor de los mismos (Pérez y col., 1999). En este sentido, diversos estudios han demostrado que las enzimas LOX y HPL son clave en la regulación de la composición de la fracción volátil emitida por los frutos (Lara y col., 2006, 2007; Villatoro y col., 2008a).

Además, se conoce que el descenso en la capacidad de sintetizar ésteres a lo largo del periodo de permanencia a 20 °C se debe a una reducida disponibilidad de sustrato (el alcohol utilizado en el último eslabón de la síntesis de ésteres) más que a una baja actividad o degradación de la enzima AAT involucrada en la fase final de la síntesis (Knee y Hatfield, 1981; Brackmann y col., 1993; Fellman y col., 1993; Fellman y Mattheis, 1995; Dixon y Hewett, 2000; Echeverría y col., 2004d; Lara y col., 2006, 2007). Esto se confirma por el hecho de que la adición de alcoholes y aminoácidos precursores consiguen provocar un aumento en la producción de volátiles en frutos de distintas variedades de manzana (Rowan y col., 1996; Harb y col., 2000).

Con los resultados obtenidos en la presente Tesis se observó que la capacidad del fruto para sintetizar compuestos volátiles después del almacenamiento se vio modificada respecto a la misma en el momento de cosecha. En el caso de la variedad 'Fuji Kiku[®] 8', se observó que, después del almacenamiento, los frutos sometidos a las condiciones ULO+4s eran los que presentaban una mayor concentración de aquellos compuestos que se consideran característicos de la variedad y que, además, estos frutos presentaron una mayor actividad de las enzimas LOX y HPL en la pulpa. Concretamente, se ha comprobado que existe una alta correlación entre la actividad de la enzima LOX en la pulpa y la concentración de estos compuestos característicos de la variedad, siendo, por consiguiente, esta enzima la que más importancia tendría en la regeneración de dichos compuestos. Ello podría explicarse por el hecho de que las condiciones de hipoxia dan lugar a una reducción parcial de aquellos procesos

dependientes de oxígeno, incluyendo la hidropoxidación de ácidos grasos, y, en consecuencia, provoca una inhibición parcial de la capacidad de emisión de los volátiles (Fellman y col., 2000; Lara y col., 2003, 2006, 2007). Este periodo adicional en frío permitiría reactivar el metabolismo de biosíntesis de ciertos ésteres. Otras nuevas tecnologías como las atmósferas controladas dinámicas han demostrado también una recuperación en la síntesis de ésteres después de 4 meses en conservación, hecho que podría mejorar el aroma y sabor de frutos almacenados en AC y que posiblemente también esté relacionado con una mayor actividad de la enzima LOX (Mattheis y col., 1998). Resultados parecidos también se obtuvieron por Saquet y col. (2000) quienes demostraron que un periodo de 3 semanas en condiciones ambientales antes de su almacenamiento en AC consiguió mantener unos niveles superiores de ácidos grasos que aquellos frutos almacenados sólo en AC.

Otra forma de mejorar la producción de compuestos volátiles sería el tratamiento de los frutos con etileno, pero se ha demostrado que este tratamiento no tiene efecto en frutos almacenados durante largos periodos en AC (Song y Bangerth, 2003). Esto puede ser debido a que la actividad de LOX parece independiente de la producción de etileno mientras que la actividad de AAT sí que es dependiente de etileno (Defilippi y col., 2005).

Se conoce que las diferencias significativas observadas entre piel y pulpa en cuanto al nivel de volátiles, precursores y enzimas relacionados con el aroma indican que el mecanismo de regulación difiere según el tipo de tejido (Rudell y col., 2002; Defilippi y col., 2005). De los resultados del análisis multivariante de los datos se extrae que la actividad de las enzimas LOX y HPL en la piel del fruto de la variedad 'Fuji Kiku[®] 8' estaba relacionada con los frutos almacenados en las condiciones ULO y ULO+2s, los cuales exhibieron una menor concentración de compuestos volátiles con respecto a aquellos sometidos al tratamiento ULO+4s. En general, hay varios estudios que demuestran que la emisión de volátiles está ligada con la actividad de la enzima LOX en la piel (Defilippi y col., 2005; Lara y col., 2006; Li y col., 2006), pero cabe resaltar que estos estudios valoraron esta actividad en los frutos sometidos a las atmósferas ULO, a atmósferas con condiciones anaeróbicas o a tratamientos con 1-MCP. En todos ellos, la emisión de compuestos volátiles fue inhibida y, por tanto, ello coincidiría con nuestros resultados que también muestran una existente relación de la actividad en la piel con las atmósferas ULO y ULO+2s (menor emisión de volátiles). De

los resultados obtenidos en la presente Tesis, podemos concluir que con la adición de un periodo adicional en frío la actividad de dicha enzima tiende a ser más alta en la pulpa. Hay pocos estudios que analicen la actividad enzimática tras este periodo de regeneración; aún así, de otros estudios referidos a condiciones de frío normal o de atmósferas con niveles de oxígeno alrededor de 2% demuestran que la actividad es parecida en ambos tejidos (Villatoro y col., 2008a).

Con la intención de ir un paso adelante y poder predecir el comportamiento de aquellos volátiles característicos (butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, acetato de 2-metilbutilo, y 2-metilbutanoato de etilo) con respecto a la actividad de los enzimas LOX y HPL (tanto en piel como en pulpa) se realizó el tratamiento de los datos experimentales mediante la técnica de regresión parcial de mínimos cuadrados. Del resultado obtenido en la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ se deduce que un 96 y 98% de la variación de las concentraciones del acetato de hexilo y del acetato de 2-metilbutilo, respectivamente, se podían explicar a partir de la actividad de estas enzimas. Especialmente hay que destacar para todos estos compuestos, la fuerte correlación de sus concentraciones con la actividad de la enzima LOX en la pulpa.

En el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’ y mediante el análisis multivariante de los datos, fue posible determinar que un 75% de la variabilidad entre los ésteres de cadena lineal más característicos de esta variedad se podía predecir mediante la actividad enzimática de LOX y HPL en los dos tejidos del fruto analizados, pero principalmente hay que destacar una vez más la importancia clave de la enzima LOX en la pulpa. También para ‘Golden Delicious’ parece claro que la disminución de volátiles después del almacenamiento en AC se debe a una disminución de los precursores, ya que al tratar los frutos con vapores de ácido acético y hexanol se observó un aumento en la concentración de los ésteres de hexilo (Olías y col., 1992). La atmósfera ULO puede también inhibir la síntesis de acetyl CoA (Harb y col., 2000). Li y col. (2006) estudiaron la actividad de la enzima AAT en la piel de manzanas ‘Golden Delicious’ y encontraron que la disminución en la producción de ésteres estaba correlacionada con una menor actividad AAT y con una disminución de la concentración de compuestos precursores, mientras que la concentración de la proteína se mantuvo relativamente a altos niveles.

De nuestros resultados podemos extraer que las atmósferas ensayadas en la presente Tesis (ULO+2s y ULO+4s) muestran una mayor actividad de la enzima LOX y por tanto una mayor producción de sustratos (alcoholes precursores) que se han sintetizado

a ésteres. Por tanto, parece que este periodo adicional en frío sería una buena solución al inconveniente de la baja emisión de volátiles provocada por las atmósferas con bajo nivel de oxígeno.

7.2. Calidad estándar

▪ *En cosecha*

Los valores de los parámetros de calidad de los frutos en el momento de cosecha tienen mucha importancia comercial ya que se considera que el estado de madurez de las manzanas en el momento de la recolección es un factor elemental para mantener una adecuada vida poscosecha así como para poder disponer de unos frutos con buena calidad gustativa en el momento de su llegada al consumidor. En este sentido, las manzanas se deben recolectar en un estado en que exista un equilibrio entre un potencial de conservación en cámara frigorífica y una capacidad para alcanzar una satisfactoria calidad organoléptica a la salida de cámara.

En la presente Tesis, los parámetros de calidad en el momento de cosecha comercial, para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, mostraron unos valores de firmeza alrededor de 72 N, unos valores de acidez de 3,3 g ácido málico L⁻¹ y un contenido de sólidos solubles alrededor de 16,2 °Brix. Estos valores son muy similares a los encontrados por otros autores para la misma variedad en la misma zona (Echeverría y col., 2002; 2004a). Estos parámetros de calidad pueden ser similares o diferenciarse de aquellos correspondientes a frutos cultivados en otras zonas geográficas dependiendo del estado de madurez en cosecha, de las condiciones ambientales propias de la zona y de las técnicas culturales aplicadas. Así, manzanas ‘Fuji Kiku[®]’ cultivadas en Brasil presentaron en cosecha unos valores medios de 80 N de firmeza, una acidez de 6,2 g ácido málico L⁻¹ y un contenido en sólidos solubles de 14,8 °Brix (Silveira y col., 2007). En un estudio realizado en Eslovenia con distintos clones de ‘Fuji’ (‘Fuji Kiku[®] 7’, ‘Fuji Kiku[®] 8’ y ‘Fuji Nagafu 6’) se detectó que en el clon ‘Fuji Kiku[®] 8’ la acidez del fruto estaba alrededor de 6-7 g ácido málico L⁻¹ (Veberic y col., 2007). De todos estos resultados se puede observar que, si bien los valores de firmeza y sólidos solubles son bastante parecidos, los valores de acidez para los frutos cultivados en nuestra zona son bastante inferiores con respecto a otros lugares del mundo, indicando ello que las condiciones climáticas propias de nuestra zona (clima caluroso y seco en verano) no

favorecen la obtención de valores elevados de acidez, a diferencia de las condiciones reinantes en otras zonas más frescas y húmedas. Un estudio realizado con las variedades 'Red Delicious', 'Gala', 'Fuji', 'Golden Delicious' y 'Braeburn' determinó que el valor óptimo de firmeza debe situarse alrededor de 62 N, destacando que la variedad 'Fuji' es adecuada para mantener estos valores de firmeza (Harker y col., 2008). Muchos autores, además, están de acuerdo en que el grado de madurez en manzanas coloreadas como 'Gala' no está relacionado con la intensidad de color rojo de la piel (Vogri y Bravos, 2004; Rapillard y Dessimoz, 2000; Sturm y col., 2003; Iglesias y col., 2008) siendo ello también aplicable a manzanas 'Delicious' y 'Fuji' (Plotto y col., 1995). Por tanto, el color rojo de superficie no puede utilizarse como índice de madurez en variedades rojas (Iglesias y col., 2008), sino que es más adecuado el color de fondo (el cual vira desde tonalidades verdes hacia tonalidades amarillentas).

Por otro lado, los parámetros de calidad en la variedad 'Golden Reinders[®] en el momento de cosecha comercial (para ambas campañas) se situaron de media alrededor de 72,9 N para la firmeza, un contenido en sólidos solubles de 13,7 °Brix y una acidez de 5,7 g ácido málico L⁻¹. Estudios anteriores en la misma zona muestran, en 'Golden Delicious', unos valores de firmeza alrededor de 66 N, valores de acidez entre 4,5-5,7 g ácido málico L⁻¹ y un contenido en sólidos solubles de alrededor de 12,5 °Brix (López y col., 1998a, 1999). Otro estudio en la zona mostró que, para tener una mayor aceptación por parte del consumidor a la salida de cámara, las manzanas en el momento de cosecha debían presentar unos valores mínimos de firmeza de 66,6 N, una acidez de 5 g ácido málico L⁻¹ y un contenido en sólidos solubles de 12,1 °Brix (Alegre y Casals, 2006). Cabe observar que nuestros frutos presentaron unos valores superiores de sólidos solubles en el momento de cosecha, y, por tanto, cabe esperar una buena aceptación de los mismos por parte del consumidor.

En otras zonas geográficas, como en Italia, los valores de firmeza en cosecha para 'Golden Delicious' estaban alrededor de 61 N, el contenido en sólidos solubles en 13,7 °Brix, y la acidez en 5,1 g ácido málico L⁻¹ (Fadanelli et al., 2005). En un estudio comparativo de variedades (realizado con 'Galaxy[®]', 'Braeburn', 'Mondial Gala[®]', 'Golden Reinders[®]' y 'Jonathan Watson') los frutos de 'Golden Reinders[®]' destacaron por su alto contenido en sólidos solubles (16 °Brix), siendo además la variedad de mayor potencial productivo (Milosevic y col., 2009). En otro estudio realizado en

Hungría con la misma variedad ‘Golden Reinders[®]’, las manzanas mostraron unos valores de firmeza de 68,8 N en cosecha (Racksó y col., 2009).

- *En almacenamiento y posterior vida comercial.*

En general, de los resultados obtenidos en nuestro estudio se pudo observar que el periodo adicional en frío después del almacenamiento en condiciones ULO, no tuvo un efecto destacado sobre los parámetros de calidad estándar de las manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’. Aún así, se observó que, para cortos periodos de conservación, los frutos almacenados en condiciones ULO mantuvieron unos valores de firmeza más elevados que aquellos frutos conservados en ULO+4s, hecho lógico si tenemos en cuenta que la transferencia de los frutos ULO a un ambiente normal habrá provocado mayor actividad degradativa de los componentes de la pared celular; de todas maneras, tras largos periodos de conservación (30 semanas) los frutos procedentes de las distintas atmósferas presentaron unos valores similares. Otros estudios han demostrado también que las atmósferas ULO permiten mantener unos elevados valores de firmeza a lo largo del almacenamiento (Echeverría y col., 2002, 2004c). Este tipo de atmósfera controlada también es beneficiosa en manzanas ‘Pink Lady[®]’ (López y col., 2007) y ‘Mondial Gala[®]’ (Echeverría y col., 2008) debido a que permite que los frutos mantengan satisfactoriamente una buena calidad a lo largo del almacenamiento.

Con respecto a las diferencias que existieron para las dos campañas estudiadas en la presente Tesis, la firmeza fue significativamente superior para los frutos de la segunda campaña y, en general, no existieron diferencias a causa de los distintos periodos de conservación ni de las diferentes condiciones atmosféricas aplicadas en el almacenamiento. Observando los valores de firmeza para los frutos recolectados en las dos fechas aplicadas en la campaña 2006/2007, podemos detectar que el mínimo valor observado fue de 69,7 N en el caso más desfavorable, correspondiente a frutos con una madurez más avanzada en cosecha y que habían estado almacenados durante 7 meses (y sometidos posteriormente a las condiciones ULO+4s, más 7 días de permanencia a 20°C). De acuerdo con un estudio que se llevó a cabo en Nueva Zelanda con el objetivo de determinar los valores óptimos de los parámetros de calidad de manzanas para satisfacer al consumidor se estableció que el mínimo de firmeza necesario era de 62 N para las variedades ‘Red Delicious’, ‘Gala’, ‘Fuji’, ‘Braeburn’ y ‘Golden Delicious’

(Harker y col., 2008). En nuestro estudio, los valores no se situaron en ningún caso por debajo de este umbral siendo ello indicativo de la buena retención de calidad que se obtuvo en todas las condiciones. Este mismo estudio citado revelaba específicamente que, para la variedad ‘Fuji’, la firmeza era el parámetro clave que definía la aceptación por el consumidor, con poca influencia del contenido de sólidos solubles y de la acidez en dicha aceptación. También se ha señalado que en peras (‘Flor de invierno’) un descenso en la aceptación por parte del consumidor fue debido principalmente a una pérdida de textura (Varela y col., 2007). Un estudio con distintos clones de manzanas ‘Gala’ mostró que, dentro del rango de buena calidad sensorial para el consumo, los consumidores tendían a preferir manzanas firmes (Iglesias y col., 2008). Por otra parte, un estudio en Estados Unidos con manzanas ‘Red Delicious’ mostró que la disponibilidad de comprar manzanas por los consumidores aumentaba un 70% si se garantizaban unos valores mínimos de firmeza de 58 N (Kupferman y col., 2005).

En consecuencia, podemos concluir de forma novedosa que nuestro estudio se demuestra que la adición de un periodo de 4 semanas en frío tras el almacenamiento en ULO no supone una disminución del potencial de mantenimiento de los valores de firmeza de manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ en comparación al almacenamiento exclusivo en una atmósfera ULO.

Por lo que se refiere al contenido de sólidos solubles y acidez, para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, el tipo de condiciones de almacenamiento ensayadas tuvo un efecto distinto en ambas campañas. Así, en los frutos procedentes de la primera campaña y conservados durante largos periodos (30 semanas) el contenido de sólidos solubles fue superior en el caso de los frutos sometidos a las condiciones ULO+4s con respecto a aquellos sometidos a las condiciones ULO+2s y ULO. Este comportamiento tuvo lugar tanto a 1 como a 7 días de permanencia a 20 °C. Esto puede ser debido a que durante estas 4 semanas en frío se posibilitó, en mayor grado que en el caso de ULO+2s o de ULO, la degradación del almidón presente en el fruto para convertirse en azúcares sencillos, siendo ello causante del aumento del nivel de sólidos solubles en el mismo. Desde un punto de vista comercial, este resultado es interesante para la producción y comercialización de manzanas españolas, que de por sí ya presentan mayores niveles de azúcares (dadas las condiciones climáticas) que otras manzanas cultivadas en otras zonas más frías y nubladas. En general, el ratio sólidos solubles/acidez fue superior para

los frutos procedentes de la segunda campaña y largos periodos de conservación (30 semanas), no existiendo diferencias provocadas por las distintas atmósferas estudiadas.

De la comparación de frutos cosechados en dos fechas distintas, en general, no existieron diferencias en el contenido de sólidos solubles, a excepción de algunos casos en que los valores de los frutos conservados en ULO fueron superiores. Cabe resaltar que no existieron, en ambas fechas, diferencias debidas al periodo de almacenamiento o al periodo de permanencia a 20 °C.

Los valores de acidez en los frutos no presentaron una tendencia clara en el caso de la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, aunque se observó un ligero descenso de este parámetro para aquellos frutos almacenados en atmósfera ULO+2s y ULO+4s. En general, el comportamiento para ambas fechas de recolección fue muy similar; aun así, cuantitativamente cabe destacar el descenso de acidez para aquellos frutos procedentes de una cosecha más avanzada tras 30 semanas de conservación.

Con respecto a la variedad ‘Golden Reinders[®]’, de la comparación entre cosechas podemos deducir que, a modo general, no existían muchas diferencias a causa de las distintas atmósferas, de los periodos de conservación o de permanencia a 20 °C. Aún así, cabe destacar que, para los frutos de la cosecha más tardía, los valores de firmeza después de someter a los mismos a las condiciones ULO+2s y ULO+4s, descendieron hasta valores cercanos a 62 N. Según Hoehn y col. (2003) la aceptabilidad de manzanas por parte del consumidor podía relacionarse con las medidas instrumentales de firmeza, recomendando dichos autores que se asegure un valor mínimo de firmeza de 44 N para ‘Golden Delicious’. Igual que en el caso anterior, también para esta variedad, el periodo adicional en frío no afectó negativamente a la firmeza de los frutos. Esto es importante porque la firmeza de los frutos está considerada como el criterio principal a la hora de determinar la calidad de consumo en manzanas. En este sentido, muchos estudios han demostrado que el almacenamiento en condiciones de muy bajo oxígeno mejoran la firmeza en un amplio perfil de variedades (Cliff y col., 1998; López y col., 1999). Comparando los resultados obtenidos (en ambas campañas) en cosecha comercial y tras 7 días de permanencia a 20 °C (momento esperado de llegada al consumidor), se observó que el comportamiento de los frutos fue distinto; para la primera campaña no existieron diferencias a causa de las distintas atmósferas, mientras que, para la segunda campaña, las condiciones de almacenamiento en ULO+2s y ULO+4s provocaron una

disminución de los valores de firmeza en los frutos con respecto a aquellos almacenados exclusivamente en ULO. En frutos almacenados en condiciones ULO+4s los valores descendieron por debajo de los 60 N pudiendo ello afectar a la aceptación por parte del consumidor.

En el caso de la variedad ‘Golden Reinders’[®], no se produjeron diferencias significativas en el nivel de sólidos solubles entre las dos campañas estudiadas, ni para las distintas fechas de recolección. Todos los valores se mantuvieron superiores a 14 °Brix, sobrepasando así el límite de 12 °Brix considerado óptimo para satisfacer los requerimientos de los consumidores (Hoehn y col., 2003; DeEll y col., 2001). Por otro lado, donde sí existieron diferencias significativas fue para los valores de acidez. Para las manzanas recolectadas en la fecha más tardía, los valores se mantuvieron inferiores con respecto a los presentes en los frutos cosechados en la fecha comercial. Además, se produjo, en general, un descenso de la acidez en los frutos conservados en las condiciones ULO+2s y ULO+4s con respecto a aquellos almacenados en ULO, llegándose a valores inferiores a 3,2 g L⁻¹, nivel mínimo recomendado para esta variedad (Hoehn y col., 2003; DeEll y col., 2001). En general, comparando los resultados para las dos campañas consecutivas, aunque en cosecha se dieron unos valores similares, también se observó un descenso de la acidez para los frutos recolectados en la segunda campaña, si bien no se observaron posteriormente diferencias a causa del tipo de atmósfera ensayada.

Con relación al color de fondo de la epidermis de los frutos, la tonalidad verde de las manzanas ‘Fuji’ se mantuvo satisfactoriamente, a excepción de aquellos frutos conservados en las condiciones ULO+4s (para largos periodos de almacenamiento), ya que los mismos presentaron una tonalidad más amarillenta, indicador de un estado de madurez más avanzado. En general, no existieron diferencias provocadas por el periodo de vida comercial. La calidad percibida en los mercados de las manzanas rojas y bicolors (como ‘Delicious’, ‘Gala’ y ‘Fuji’) está determinada básicamente por la apariencia visual. Incluso con un adecuado calibre, un color rojo insuficiente es un factor importante para disminuir las ventas (Iglesias y Alegre, 2006) puesto que se asocia a una pobre aceptación visual por parte del consumidor (Crasweller y Hollender, 1989; Baugher y col., 1989). Además de la apariencia, la calidad engloba a otros parámetros como el aroma, el gusto y la textura. Sin embargo, la apariencia es el criterio más importante en la decisión de comprar manzanas (Salveit, 1983; MacFie, 1995;

Harker, 2001; Donati y col., 2003). En el caso de la variedad ‘Golden Reinders[®]’, se detectaron diferencias entre los frutos en relación al color de fondo de epidermis, al final de largos periodos de almacenamiento (30 semanas), presentando los frutos de la primera campaña una tonalidad más amarillenta (valores menores de Tono) que los de la segunda campaña. Por otro lado, no se observaron diferencias causadas por las diversas condiciones de almacenamiento estudiadas. Algunos autores han estudiado ampliamente la variabilidad entre frutos correspondientes a distintas campañas, y han establecido que esta variabilidad es muy importante a la hora de determinar el estado de madurez del fruto (Tijsskens y col., 2009).

Finalmente, cabe recordar que una buena calidad en una partida de frutos precisa de la ausencia o baja incidencia de defectos y alteraciones. En este sentido, en la variedad ‘Golden Reinders[®]’ no observamos alteraciones en ninguna de las atmósferas estudiadas ni para los distintos periodos de almacenamiento. En cambio, para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’, las alteraciones más destacables fueron el “escaldado solar” (debido a que los árboles eran jóvenes y con mucha incidencia solar), llegando incluso su incidencia al 40%, y la presencia de “cracking” (alrededor de un 15%); sin embargo, no se detectaron alteraciones originadas por las condiciones de almacenamiento aplicadas en nuestros estudios.

7.3. Calidad sensorial.

En manzanas ‘Fuji Kiku[®] 8’ no se observaron diferencias significativas en el grado de aceptación sensorial determinado mediante panel de consumidores en la primera campaña. En relación con los atributos sensoriales evaluados, cabe destacar que respecto al *sabor* se obtuvieron puntuaciones más altas tras cortos periodos de frigoconservación y en frutos procedentes de las atmósferas ULO+2s y ULO+4s, frutos que a su vez fueron los que presentaron una mayor emisión de compuestos volátiles tal como hemos citado anteriormente. Cabe recordar aquí que la percepción del sabor de un alimento está influenciada por la textura, el aroma y el gusto de ese alimento (Noble y col., 1991; Hornung y Enns 1994; Negoias y col., 2008). Además, se conoce que el sabor de un fruto está caracterizado no tanto por la emisión total de compuestos volátiles, sino por las unidades de olor de algunos de ellos (Echeverría y col., 2004e). En general, para el atributo *dulzor* no existieron diferencias a causa del tipo de

atmósferas y periodos de conservación, a excepción de aquellos frutos conservados durante un largo periodo y almacenados en condiciones ULO+4s (que presentaron los mayores valores); dichos frutos también presentaron un valor más alto del contenido en sólidos solubles. Esta alta correlación de la percepción del *dulzor* con el contenido en sólidos solubles no ha sido observada por otros autores (Echeverría y col., 2004e; Duran and Costell, 1999) los cuales indican que la percepción del *dulzor* puede verse modificada por los niveles de acidez titulable, y por ciertos compuestos volátiles. Con relación al atributo de *acidez* no se observaron, en general, diferencias a causa de las distintas condiciones de almacenamiento aplicadas. Este resultado podría ser debido a que la variedad 'Fuji' es una variedad poca ácida y por tanto las pequeñas variaciones debidas a las condiciones de conservación no son suficientes para ser detectadas por los consumidores (Harker y col., 2002a). Los atributos de *firmeza* y *jugosidad* evaluados por los consumidores han sido destacados (junto con la crocancia) como los atributos de textura más importantes en manzanas 'Fuji' (Trillot y col., 1993; Masseron y col., 1995; Mantinguer, 1998). En nuestro caso, para cortos periodos de frigoconservación (19 semanas) los frutos procedentes de la atmósfera ULO+2s fueron los que obtuvieron una mayor puntuación de dichos atributos, mientras que para largos periodos de conservación no se detectaron diferencias. Para la *jugosidad*, los frutos procedentes de ULO+4s obtuvieron mayor puntuación, pero sólo para cortos periodos (19 semanas), mientras que al cabo de 30 semanas ya no se detectaron diferencias.

Si analizamos de forma conjunta la importancia de todos los compuestos volátiles detectados, de los parámetros de calidad medidos instrumentalmente y de los atributos sensoriales, y su repercusión sobre la aceptación por parte del consumidor, se puede concluir que algunos compuestos volátiles como el acetato de metilo, el acetato de octilo, el hexanoato de etilo, el propanoato de 2-metilpropilo, el 2-metilpropanoato de butilo y el 2-metilbutanoato de etilo como ésteres y el 2-metil-1-butanol como alcohol tuvieron un peso destacable en la aceptación de los frutos. La influencia de ciertos compuestos volátiles en la aceptación también ha sido expuesta por otros autores (Lavilla y col., 1999; Echeverría y col., 2004c). En la presente Tesis, las condiciones ULO+4s consiguieron aumentar la concentración de ellos y, por tanto, se puede inferir que los frutos conservados en esta atmósfera verán potenciado su sabor. Los parámetros instrumentales de calidad estándar con mayor influencia en la aceptación fueron la

acidez y el contenido en sólidos solubles, resultados que corroboran resultados obtenidos en otros trabajos (Alavoine y col., 1990; Echeverría y col., 2004e).

Una vez analizados todos los datos mediante análisis multivariante, podemos concluir que los frutos con una menor aceptación sensorial fueron aquellos conservados en atmósfera ULO siendo a la vez los que mostraban un menor contenido en volátiles totales. Durante la segunda campaña, un panel de jueces entrenados en la descripción de los atributos sensoriales (*dulzor, acidez, crocancia, firmeza, jugosidad, harinosidad* y *sabor a manzana*) evaluaron los frutos procedentes de las distintas atmósferas de conservación objeto de estudio. Los resultados obtenidos para la variedad ‘Fuji Kiku[®] 8’ muestran que no hubo diferencias a causa de las distintas atmósferas de almacenamiento. Sin embargo, hubo un aumento de la harinosidad para aquellos frutos cosechados de forma tardía y almacenados durante 30 semanas. En esta segunda campaña sí que existieron diferencias en la aceptación, siendo los frutos procedentes de las atmósferas ULO+2s y ULO+4s (después de 19 semanas de frigoconservación) los que presentaron mayores valores (datos no mostrados). Para largos periodos de conservación (30 semanas) no se detectaron tales diferencias. De la comparación del efecto de las atmósferas en los frutos cosechados en las dos fechas distintas no se observaron diferencias en cuanto al comportamiento.

Para la variedad ‘Golden Reinders[®]’ no existieron muchas diferencias en el grado de aceptación sensorial (evaluado mediante un panel de consumidores). No hubo pues una influencia clara ni de la atmósfera ni del periodo de conservación sobre la aceptación de los frutos, si bien los frutos almacenados en ULO mostraron una menor puntuación, ésta no siempre fue significativa. Los frutos peor valorados, en la primera campaña, fueron aquellos conservados en atmósfera ULO durante un largo periodo de conservación (30 semanas). En general, para la segunda campaña tampoco se observó una clara diferencia en la evaluación de la aceptación dependiendo de la atmósfera y/o periodo de conservación, a excepción de los frutos almacenados en la atmósfera ULO+4s durante 19 semanas más 7 días a 20 °C (los cuales presentaron mayor valoración que los frutos almacenados en ULO).

Con relación a la descripción de los atributos sensoriales realizada mediante un panel de jueces entrenados, cabe destacar que, en general, para las dos campañas analizadas se detectó una disminución en la *acidez*, la *firmeza* y la *crocancia* para

aquellos frutos almacenados en condiciones ULO+2s y ULO+4s. Otros autores han sugerido que existe una relación indirecta en la percepción de los parámetros de *firmeza* y *acidez* medidos sensorialmente, de forma que aquellos frutos que son percibidos como menos firmes a su vez se tienden a valorar como menos ácidos (Konopacka y Plocharski, 2004). La importancia de los atributos de textura varía entre los distintos tipos de frutos aunque está demostrado que es mayor para frutos como las manzanas y las peras (Péneau y col., 2007). Entre los resultados obtenidos en nuestros estudios referidos a ambas variedades no se observaron cambios en cuanto al atributo de *jugosidad*; este resultado es interesante si tenemos en cuenta que el atributo de jugosidad es muy importante para el consumidor, tanto en frutos que tienen una textura más dura y crocante, como las manzanas como en frutos de textura más blanda, como los melocotones (Harker y col., 2003).

De la relación entre las medidas instrumentales y sensoriales, estudios previos han demostrado que las diferencias relacionadas con la textura del fruto no se pueden predecir adecuadamente con las medidas instrumentales; por tanto, parece fundamental el disponer de las valoraciones de un panel de jueces entrenados (capaces de detectar diferencias de firmeza mayores que 5 N) (Harker y col., 2002a).

Esta pérdida de *acidez* sensorial en las manzanas ‘Golden Reinders[®]’ se corresponde con una pérdida de los valores de acidez titulable (determinada mediante medidas instrumentales). Estos resultados corroboran los de otros trabajos que manifiestan que el atributo de *acidez* puede ser predicho con bastante exactitud mediante el valor de acidez titulable (Harker y col., 2002b; Echeverría y col., 2004e). Sin embargo, los atributos de *dulzor* y *sabor* siguen necesitando la valoración mediante un panel entrenado. Tal como demuestran nuestros resultados sobre los distintos atributos sensoriales, y en concordancia con trabajos anteriores, las manzanas ‘Golden Reinders[®]’ (variedad mutante de ‘Golden Delicious’) pierden firmeza de forma marcada durante el almacenamiento, a diferencia de las manzanas ‘Fuji’ (Billy y col., 2008).

Es conveniente recordar aquí la recomendación de que en los programas de mejora se debe tener en cuenta aquellos caracteres medidos instrumentalmente, puesto que tienen más poder hereditario que aquellos medidos sensorialmente (Oraguzie y col., 2009).

Vistos los resultados precedentes sobre la importancia de los volátiles en la percepción de la calidad sensorial sería deseable disponer de modelos para valorar la influencia específica de cada tipo de compuestos. Los modelos más utilizados hasta el momento han sido los zumos y los purés (Young y col., 1996; Ball y col., 1998; Rossiter y col., 2000; Marsh y col., 2006). Sin embargo, estos productos utilizados como modelos presentan el inconveniente de no poder ofrecer cierta aproximación a la realidad del producto entero debido a que carecen del atributo de *firmeza* tan importante en manzanas. La textura está determinada por la estructura del tejido del fruto; también los atributos de *crocantidad* y *jugosidad* juegan un papel muy importante (Daillant-Spinnler y col., 1996). Con el objetivo de poder medir la influencia que tienen los distintos volátiles en la percepción por parte del consumidor, en un estudio llevado a cabo en Nueva Zelanda inyectamos distintas esencias aromáticas (chocolate, manzana, tropical y salmón) en tejidos de pulpa en manzanas de la variedad ‘Pacific Rose[®]’. De los resultados se dedujo que el método propuesto parece ser muy útil a la hora de explorar las preferencias de los consumidores hacia nuevos sabores. En general, la mayoría de los consumidores estuvieron de acuerdo en que el hecho de probar la muestra con el nuevo sabor les ofrecía una mejor indicación de lo que sería comer un fruto entero, posiblemente debido a que les permitió percibir conjuntamente la textura y el sabor de las muestras. La muestra que tuvo más sentido para los consumidores de Nueva Zelanda fue la esencia tropical. Además, fueron dos los factores que tuvieron influencia en su respuesta: la calidad de la esencia y la interacción de la esencia con la matriz del tejido de manzana (Meilgaard et al., 2007). Como conclusión, con este tipo de modelo podemos preveer de forma anticipada el grado de aceptación del consumidor hacia nuevos sabores. Ello tiene una consecuencia práctica importante, puesto que, de este modo seríamos capaces de transferir esta información a los programas de mejora genética de variedades. Así, la obtención de nuevas variedades iría dirigida ya hacia aquellos sabores que los consumidores han aceptado previamente, evitando el coste económico en los complejos y laboriosos programas de mejora varietal.

7.4. Bibliografía.

Alavoine, F.; Crochon, M.; Bouillon, C. 1990. Practical methods to estimate taste quality of fruit: how to tell it to the consumer. *Acta Horticulturae*, 259, 61-68.

- Alegre, S.; Casals, M.** 2006. Criteris de collita per poma Gala i Golden: l'opinió del consumidor. XI Jornada Frutícola.
- Argenta, L. C.; Mattheis, J. P.; Fan, X.; Finger, F. L.** 2004. Production of volatile compounds by Fuji apples following exposure to high CO₂ or low O₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5957-5963.
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K.; Schuch, W.** 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35, 1013-1021.
- Ball, R. D.; Murray, S. H.; Young, H.; Gilbert, J. M.** 1998. Statistical analysis relating analytical and consumer panel assessments of kiwifruit flavour compounds in a model juice base. *Food Quality and Preference*, 9, 255-266.
- Baughner, T. A.; Hogmire, H. W.; Lightner, T.** 1990. Determubing apple packout losses and impact of profitability. *Applied Agricultural Research*, 5, 23-26.
- Billy, L.; Mehinagic, E.; Royer, G.; Renard, C. M. G. C.; Arvisenet, G.; Prost, C.; Jourjon, F.** 2008. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 315-324.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1993. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 243-247.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 1994. Influence of CA and ULO storage conditions on quality parameters and ripening of preclimateric and climateric harvested apples. I. Effect on colour, firmness, acidity and SS. *Gartenbauwissenschaft*, 59, 252-257.
- Burdock, G. A.** 2002. *Handbook of Flavor Ingredients*, 4th ed. CRC Press.
- Cliff, M. A.; Marjorie, K.C.; MacDonald, R. A.** 1998. Sensory characteristics of four strains of 'Fuji' apples. *Fruit Varieties Journal*, 52, 205-210.
- Crasweller, R. M.; Hollender, R. A.** 1989. Consumer evaluations of 'Delicious' apple strains. *Fruit Varieties Journal*, 43, 139-142.
- Dailant-Spinnler, B.; MacFie, H. J. H.; Beyts, P. K.; Hedderley, D.** 1996. Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. *Food Quality and Preference*, 7, 113-126.
- DeEll, J. R.; Khanizadeh, S.; Saad, F.; Ferree, D. C.** 2001. Factors affecting apple fruit firmness-a review. *Journal of the American Pomological Society*, 55, 8-27.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5694-5701.

- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A.** 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3133-3141.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C.** 1983. Review of apple flavor—state of the art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 387–409.
- Dirinck, P.; Schamp, N.** 1989. Instrumental aroma analysis for objective evaluation of the parameters influencing aroma formation in apples and for prediction of the optimum picking date. *Acta Horticulturae*, 258, 421-428.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 155-173.
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** 2001. Exposure to hypoxia conditions alters volatile concentrations of apple cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 22-29.
- Donati, F.; Gianini, A.; Sansavini, S.; Guerra, W.; Stainer, R.; Pellegrino, S.** 2003. Valutazioni qualitative sensoriali di nuove mele di diversa provenienza. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 65, 65-71.
- Durán, L.; Costell, E.** 1999. Revisión: Percepción del gusto. Aspectos físicoquímicos y psicofísicos. *Food Science and Technology Internacional*, 5, 299-309.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2002. Effect of harvest date and storage conditions on quality and aroma production of ‘Fuji’ apples. *Food Science and Technology International*, 8, 351-359.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2004a. Aroma volatile compounds of ‘Fuji’ apples in relation to harvest date and cold storage technology. A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 29-44.
- Echeverría, G.; Graell, J.; Lopez, M. L.; Lara, I.** 2004b. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.
- Echeverría, G.; Fuentes, T.; Graell, J.; López, M. L.** 2004c. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of ‘Fuji’ apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 5-20.
- Echeverría, G.; Graell, J.; Lopez, M. L.; Lara, I.** 2004d. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 217-227.
- Echeverría, G.; Lara, I.; López, M. L.; Graell, J.; Puy, J.** 2004e. Assessment of relationship between sensory and instrumental quality of controlled-atmosphere-stored ‘Fuji’ apples by multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 69, 368-375.

- Echeverría, G.; Graell, J.; Lara, I.; López, M. L.** 2008. Physicochemical measurements in 'Mondial Gala[®]' apples stored at different atmospheres: influence on consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 135-144.
- Fadanelli, L.; Comai, M.; Dorigoni, A.; Mattivi, F.; Boschetti, A.** 2005. Influence of crop load and production site on quality of 'Golden Delicious' apples during storage. *Acta Horticulturae*, 682, 749-757.
- Fan, X.; Mattheis, J. P.; Patterson, M. E.; Fellman, J. K.** 1997. Optimum harvest date and controlled atmosphere storage of 'Fuji' apples. In *Apples and Pears. Proceedings of the 7th International CA Conference-2*; Mitcham, E. J., Ed.; pp 235-240.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Bostick, B.; Mattheis, J. P.; Patterson, M.** 1993. Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 3, 201-214.
- Fellman, J. K.; Mattheis, J. P.** 1995. Ester biosynthesis in relation to harvest maturity and controlled-atmosphere storage of apples. In *Fruit flavors: biogenesis, characterization, and authentication*, Leahy, M.; Rouseff, R. Eds.; American Chemical Society: Washington, DC; pp. 149-162.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Fan, X.; Mattheis, J. P.** 1997. 'Fuji' apple storage characteristics in relation to growing conditions and harvest maturity in Washington State. In *Apples and Pears. Proceedings of the 7th International CA Conference-2*; Mitcham, E. J., Ed.; pp 234.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35, 1026-1033.
- Fellman, J. K.; Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.** 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 39-51.
- Ferrandino, A.; Duverney, C.; Di Stefano, R.** 2001. Quality and aroma of Golden Delicious apples as influenced by the harvest date and the storage period. *Acta Horticulturae*, 553, 225-227.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H.** 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in 'Delicious'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 29-35.
- Fuhrmann, E.; Grosch, W.** 2002. Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange. *Nahrung*, 46, 187-193.
- Hansen, K., Poll, L., Olsen, C., Lewis, M.** 1992. The influence of oxygen concentration in storage atmospheres on the post-storage volatile ester production of 'Jonagold apples'. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 25, 457-461.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F.** 2000. Response of controlled atmosphere (CA) stored 'Golden Delicious' apples to the treatments with alcohols and aldehydes as aroma precursors. *Gartenbauwissenschaft*, 65, 154-161.

- Harker, R.** 2001. Consumer response to apples. Washington Tree Fruit Postharvest Conference, Wenatchee, WA.
- Harker, F. R.; Maindonald, J.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Hallett, I. C.; Walker, S. B.** 2002a. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Harker, F. R.; Marsh, K. B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002b. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: Sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Harker, F. R.; Lau, K.; Gunson, A.** 2003. Juiciness of fresh fruit: a time-intensity study. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 55-60.
- Harker, F. R.; Kupferman, E. M.; Marin, A. B.; Gunson, F. A.; Triggs, C. M.** 2008. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 70-78.
- Hoehn, E.; Gasser, F.; Guggenbühl, B.; Künsch, U.** 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 27-37.
- Hornung, D. E.; Enns, M. P.** 1994. The synergistic action of the taste and smell components of flavor. In *Synergy. Intercept*; Birch, G., Campbell-Platt, G., Eds.; Andover, UK; pp 145-154.
- Iglesias, I.; Alegre, S.** 2006. The effect of anti-hail nets on fruit protection, radiation, temperature, quality and profitability of 'Mondial Gala' apples. *Journal of Applied Horticulture*, 8, 91-100.
- Iglesias, I.; Echeverría, G.; Soria, Y.** 2008. Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight 'Gala' apple strains. *Scientia Horticulturae*, 119, 32-40.
- Jobling, J. J.; McGlasson, W. B.** 1995. A comparison of ethylene production, maturity and controlled atmosphere storage life of 'Gala', 'Fuji' and 'Lady Williams' apples (*Malus domestica*, Borkh.). *Postharvest Biology and Technology*, 6, 209-218.
- Knee, M.; Hatfield, S. G. S.** 1981. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 593-600.
- Konopacka, D.; Plochanski, W. J.** 2004. Effect of storage conditions on the relationship between apple firmness and texture acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 205-211.
- Kupferman, E. M.; Marin, A.; Harker, R.** 2005. Using consumers to determine standards for Red Delicious apple edible quality. *Acta Horticulturae*, 687, 229-234.
- Lalel, H. J. D.; Singh, Z.; Tan, S. C.** 2003. The role of ethylene in mango fruit aroma volatile biosynthesis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 485-496.

- Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L.** 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 29-39.
- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G.** 2006. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 19-28.
- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M.L.** 2007. Volatile emission after controlled atmosphere storage of Mondial Gala apples (*Malus domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6087-6095.
- Lavilla, T., Puy, J., López, M.L., Recasens, I., Vendrell, M.** 1999. Relationships between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in 'Granny Smith' apples stored in different controlled-atmosphere treatments by multivariate analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 3791-3803.
- Li, D.; Xu, Y.; Xu, G.; Gu, L.; Li, D.; Shu, H.** 2006. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (MdAAT2) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, 67, 658-667.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998a. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *Journal of Food Quality*, 21, 155-166.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Recasens, I.; Riba, M.; Vendrell, M.** 1998b. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by 'Starking Delicious' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 634-643.
- López, M. L.; Lavilla, T.; Graell, J.; Recasens, I.; Vendrell, M.** 1999. Effect of different CA conditions on aroma and quality of Golden Delicious apples. *Journal of Food Quality*, 22, 583-594.
- López, M. L.; Lavilla, M. T.; Recasens, I.; Graell, J.; Vendrell, M.** 2000. Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 311-324.
- López, M. L.; Villatoro, C.; Fuentes, T.; Graell, J.; Lara, I.; Echeverría, G.** 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady®' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 55-66.
- Mantinger, G.** 1998. La coltivazione della mela 'Fuji' in Alto Adige. *Rivista Frutticoltura*, 6, 25-29.
- Marsh, K. B.; Friel, E. N.; Gunson, A.; Lund, C.; MacRae, E.** 2006. Perception of flavour in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars. *Food Quality and Preference*, 17, 376-386.
- Masseron, A.; Trillot, M.; Mathieu, V.; Tronel, C.** 1995. *Fuji*. CTIFL.
- Matich, A.; Rowan, D.** 2007. Pathways analysis of branched-chain esters biosynthesis in apples using deuterium labeling and enantioselective gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2727-2735.

- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1991. Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1602-1605.
- Mattheis, J.; Fellman, J.** 1992. Delicious apple response to sequential controlled atmosphere storage. In *Proceedings of the Tree Fruit Postharvest Conference*; Washington State Horticultural Association: Wenatchee, WA; pp 22-24.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 194-199.
- Mattheis, J. P.; Buchanan, D. A.; Fellman, J. K.** 1998. Volatile compounds emitted by 'Gala' apples following dynamic atmosphere storage. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 123, 426-432.
- Mattheis, J. P.; Fan, X.; Argenta, L. C.** 2005. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4510-4516.
- McFie, H.** 1995. Consumer preference and sensory studies on southern and northern hemisphere dessert apples. *Eur. Apple*, 3, 12-13.
- 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. C. ; Civille, G. V. ; Carr, B. T.** 2007. *Sensory evaluation techniques*. 4th Edition. CRC Press, Boca Raton. pp 448.
- Milosevic, N.; Milosevic, T.; Gísic, I.** 2009. Productive and organoleptic traits of recent apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 825, 565-570.
- Motosugi, H.; Young-Ping-Gao, Sugiera, A.** 1995. Rootstock effects on fruit quality of 'Fuji' apples grown with ammonium or nitrate nitrogen in sand cultura. *Scientia Horticulturae*, 61, 205-214.
- Moya-León, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C.; Pereira, M.; Moggia, C.** 2007. Development of aroma compounds and sensory quality of 'Royal Gala' apples during storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 403-413.
- Negoias, S.; Visschers, R.; Boelrijk, A.; Hummel, T.** 2008. New ways to understand aroma perception. *Reviews in Food Chemistry*, 108, 1247- 1254.
- Noble, A. C.; Matysiak, N. L.; Bonnans, S.** 1991. Factors affecting the time-intensity parameters of sweetness. *Food Technology*, 45, 121-126.
- Olías, J. M.; Sanz, L. C.; Ríos, J. J.; Pérez, A. G.** 1992. Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in Golden Delicious apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 266-270.

- Olías, J. M.; Pérez, A. G.; Ríos, J. J.; Sanz, L. C.** 1993. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the 'green' odour notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2368-2373.
- Oraguzie, N.; Alspach, P.; Volz, R.; Whitworth, C.; Ranatunga, C.; Weskett, R.; Harker, R.** 2009. Postharvest assessment of fruit quality parameters in apple using both instruments and an expert panel. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 279-287.
- Péneau, S.; Brockhoff, P. B.; Hoehn, E.; Escher, F.; Nuessli, J.** 2007. Relating consumer evaluation of apple freshness to sensory and physico-chemical measurements. *Journal of Sensory Studies*, 22, 313-335.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Olías, J. M.** 1999. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 249-253.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 1999. Characterization of 'Gala' apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 416-423.
- Plotto, A.; McDaniel, M. R.; Mattheis, J. P.** 2000. Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 714
- Poll, L.; Hansen, K.** 1990. Reproducibility of headspace analysis of apples and apple juice. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 23, 481-483.
- Racsó, J.; Miller, D. D.; Duarte, E. E.; Szabó, Z.; Soltész, M.; Nyéki, J.** 2009. Consumer preference for apple cultivars grown in various countries: a case study with hungarian consumers. *Acta Horticulturae*, 831, 219-226.
- Raffo, A.; Kelderer, M.; Paoletti, F.; Zanella, A.** 2009. Impact of innovative controlled atmosphere storage technologies and postharvest treatments on volatile compound production in cv. Pinova apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 915-923.
- Rapillard, C.; Dessimoz, A.** 2000. Different mutants de 'Gala'. *Revue Suisse Viticulture Horticulture*, 32, 233-237.
- Rizzolo, A.; Polesello, A.; Teleky-Vamosy, G. Y.** 1989. CGC/Sensory analysis of volatile compounds developed from ripening apple fruit. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12, 824-827.
- Rizzolo, A.; Grassi, M.; Eccher Zerbini, P.** 2006. Influence of harvest date on ripening and volatile compounds in the scab-resistant apple cultivar 'Golden Orange'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81, 681-690.
- Rossiter, K. L.; Young, H.; Walker, S. B.; Miller, M.; Dawson, D. M.** 2000. Effect of sugars and acids on consumer acceptability of kiwifruit. *Journal of Sensory Studies*, 15, 241-250.
- Róth, E.; Berna, A.; Beullens, K.; Yarramraju, S.; Lammertyn, J.; Schenk, A.; Nicolai, B.** 2007. Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 11-19.

- Rowan, D. D.; Lane, H. P.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B.** 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3276-3285.
- Rudell, D. R.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P.; Wyllie, S. G.; Fellman, J. K.** 2002. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of 'Redchief Delicious' apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2627-2632.
- Saftner, R. A.; Abbott, J. A.; Conway, W. S.; Barden, C. L.; Vinyard, R. T.** 2002. Instrumental and sensory quality characteristics of 'Gala' apples in response to prestorage heat, controlled atmosphere, and air storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 1006-1012.
- Salveit, M. E.** 1983. Relationship between ethylene production and taste panel preference of 'Starkrimson Red Delicious' apples. *Canadian Journal of Plant Science*, 63, 303-306.
- Saquet, A. A.; Streif, J.; Bangerth, F.** 2003. Impaired aroma production of CA-stored 'Jonagold' apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentrations. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 695-705.
- Silveira, A. C.; Sautter, C. K.; Tonetto de Freitas, S.; Galietta, G.; Brackmann, A.** 2007. Determinación de algunos atributos de calidad de la variedad Fuji y sus mutantes al momento de cosecha. *Ciencia y Tecnología Alimentarias*, 27, 149-153.
- Smith, S. M.** 1984. Improvement of aroma of Cox's Orange Pippin apples stored in low oxygen atmospheres. *Journal of Horticultural Science*, 59, 515-522.
- Song, J.; Bangerth, F.** 1994. Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity. *Acta Horticulturae*, 368, 150-159.
- Song, J.; Bangerth, F.** 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 259-269.
- Song, J.; Bangerth, F.** 2003. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climateric and climateric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 113-121.
- Streif, J.; Bangerth, F.** 1988. Production of volatile aroma substances by 'Golden Delicious' apple fruits after storage for various times in different CO₂ and O₂ concentrations. *Journal of Horticultural Science*, 63, 193-199.
- Sturm, K.; Hudina, M.; Solar, A.; Marn, M. V.; Stampar, F.** 2003. Fruit quality of different 'Gala' clones. *European Journal of Horticultural Science*, 68, 169-175.
- Tijskens, L. M. M.; Unuk, T.; Tojnko, S.; Hribar, J.; Simcic, M.** 2009. Biological variation in the colour development of Golden Delicious apples in the orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2045-2051.
- Tough, H. J.; Hewett, E. W.** 2001. Rapid reduction in aroma volatiles of Pacific Rose™ apples in controlled atmospheres. *Acta Horticulturae*, 553, 219-223.

- Trillot, M.; Masseron, A.; Tronel, C.** 1993. *Pomme: les variétés*. Ctifl. Paris, pp. 203.
- Varela, P.; Salvador, A.; Hernando, I.; Pérez-Munuera, I.; Quiles, A.; Lluch, M. A.; Fiszman, S. M.** 2007. Eating quality of 'Flor de Invierno' pears: chemical and structural aspects. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1052-1058.
- Veberic, R.; Zadavec, P.; Stampar, F.** 2007. Fruit quality of 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.) strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 593-599.
- Villatoro, C.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I.** 2008a. Long-term storage of Pink Lady apples modifies volatile-involved enzyme activities: consequences on production of volatile esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9166-9174.
- Villatoro, C.** 2008b. Avaluació de la qualitat aromàtica, estàndard, sensorial i sanitària de poma 'Pink Lady®' durant la maduració i frigoconservació. Tesis Doctoral.
- Villatoro, C.; López, M. L.; Echeverría, G.; Graell, J.** 2009. Effect of controlled atmospheres and shelf life period on concentrations of volatile substances released by 'Pink Lady®' apples and on consumer acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1023-1034.
- Vogri, A.; Kravos, A.** 2004. Organoleptic evaluation of some apple varieties. *Zbornik Referatov*, 1, 649-653.
- Wyllie, S.; Fellman, J.** 2000. Formation of volatile branched-chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3493-3496.
- Yahia, E. M.; Liu, F. W.; Acree, T. E.** 1991. Changes of some odour-active volatiles in low-ethylene controlled atmosphere-stored apples. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 24, 145-151.
- Yamada, H.; Ohmura, H.; Ara, C.; Terui, M.** 1994. Effect of preharvest fruit temperature on ripening, sugars and watercore occurrences in apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 1208-1214.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.
- Young, H.; Rossier, K.; Wang, M.; Miller, M.** 1999. Characterization of Royal Gala apple aroma using electronic nose technology-potential maturity indicator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5173-5177.
- Young, J. C.; George Chu, C. L.; Lu, X.; Zhu, H.** 2004. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086-8093.

Conclusiones



8. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente Tesis y en relación a los objetivos planteados en la misma, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

En la variedad Fuji Kiku® 8:

- Un periodo de 4 semanas en frío posterior al almacenamiento en ULO fue el tratamiento más efectivo para aumentar la concentración total de los compuestos volátiles y también de aquellos que contribuyen al aroma característico de la variedad. El periodo de almacenamiento (durante 19 y 30 semanas) y el periodo de vida comercial (1 y 7 días a 20 °C) no tuvieron influencia sobre la emisión de compuestos volátiles.
- La mayor emisión de compuestos volátiles estuvo relacionada con una mayor actividad de la enzima lipoxigenasa en la pulpa del fruto.
- El periodo adicional en frío posterior al almacenamiento en ULO, y los periodos de almacenamiento y vida comercial analizados no afectaron el contenido de sólidos solubles; en cambio, sí produjeron un ligero descenso de la firmeza y de la acidez titulable.
- El periodo adicional en frío y los periodos de almacenamiento analizados no produjeron diferencias significativas en el grado de aceptación (mediante un panel de consumidores) ni en la evaluación de los atributos sensoriales (mediante un panel de jueces entrenados).
- La producción de volátiles, la calidad estándar y la calidad sensorial de esta variedad fue similar en las dos campañas estudiadas, en respuesta a los periodos adicionales en frío y a los periodos de almacenamiento y vida comercial aplicados. Tampoco se observaron diferencias a causa de las fechas distintas de recolección.

En la variedad Golden Reinders®:

- En general, para cortos periodos de conservación (19 semanas) el periodo adicional de 4 semanas en frío fue el más efectivo para aumentar la concentración total de los compuestos volátiles y de aquellos característicos de la variedad. En cambio, tras largos periodos de conservación (30 semanas), un

periodo adicional de 2 semanas en frío fue suficiente para incrementar dicha concentración. La emisión de compuestos volátiles tras 7 días fue mayor que a 1 día de vida comercial.

- De forma similar a la variedad anterior, la mayor emisión de compuestos volátiles estuvo relacionada con una mayor actividad de la enzima lipoxigenasa en la pulpa.
- En esta variedad, la influencia de los distintos factores estudiados produjo un descenso de la firmeza y acidez más marcado que en la variedad anterior.
- Los factores estudiados tampoco tuvieron influencia sobre el grado de aceptación sensorial, aunque sí se observó que el periodo adicional de 4 semanas en frío (después de 30 semanas de frigoconservación) causó una menor valoración de la intensidad de los atributos de *firmeza*, *acidez* y *crocantidad*.
- La producción de volátiles, la calidad estándar y la calidad sensorial de esta variedad fue similar en las dos campañas estudiadas, en respuesta a los periodos adicionales en frío y a los periodos de almacenamiento y vida comercial aplicados.
- Una fecha de cosecha más tardía no tuvo influencia sobre la emisión de compuestos volátiles aunque sí provocó una disminución significativa en algunos parámetros de calidad estándar (firmeza y acidez) y atributos sensoriales (*firmeza* y *acidez*)
- Del estudio de la vida útil de las manzanas ‘Golden Reinders[®]’, se puede concluir que el periodo óptimo de permanencia a 20 °C (a la salida del almacenamiento en condiciones ULO) estaría entre 7 y 14 días.



Anejo

Injection of flavour essences into fruit pieces: a new approach for exploring consumer preferences for novel flavours of apple fruit.

Rosa Altisent¹, Sara R. Jaeger² y F. Roger Harker²

¹ Àrea de PostCollita, XaRTA, UdL-IRTA, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

² The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited Private Bag 92169, Auckland Mail Centre Auckland, New Zealand.

Abstract

The effectiveness of fruit breeding programmes will be improved by having clear targets for enhanced and novel flavours. A broader range of flavours could be assessed by incorporation naturally occurring volatiles into juices or pulps. However, juices and pulps are not realistic representations of whole fruit, since texture plays a dominant role in consumer perception of fruit quality and affects flavour release. For this reason, we have explored the possibility of injecting volatiles and essences directly into pieces of fruit as a model system to study consumer perceptions and preferences for novel fruit flavours. Small volumes (1µL) of flavour essences ‘Tropical’, ‘Smoked Salmon’, ‘Chocolate’ and ‘Apple’ were injected into cubes of apple tissue. Fifty-two consumers were asked how much they like apples with these flavours before and after tasting. Liking, certainty of response and consumption intention were collected using 9-point category scales. After consumers were informed of the flavour of the samples, they were asked a series of questions about the taste experience. The study demonstrated that the injection of volatiles/essences into pieces of apple tissue was a useful model for exploring consumer preferences for novel flavours. Overall consumers agreed or agreed strongly with the statement that provision of samples representing the flavour concepts provided a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour.

Keywords: appropriateness, certainty, consumer, liking, novel flavours, variety seeking tendency

1. Introduction

Consumers' choice of fruit and vegetables is usually based on flavour preferences and the expectation of health and wellness outcomes, while high price, lack of convenience and the risk that the produce will become overripe or decayed before it is eaten often represent barriers to consumption (Anon, 2005). Fruit breeding programmes tend to have diverse product targets, for example associated with improved convenience (Harker et al., 2007), however the development of improved and novel flavours continues to remain a primary focus in new product development (Harker et al., 2005; Wismer et al., 2005). Since the mid-1990's consumer preference mapping of major fruit crops has become a popular tool to help identify gaps in the product space and sensory attributes that drive consumer preference for flavour (apple – Dailliant-Spinnler et al., 1996; kiwifruit – Jaeger et al., 2003a; Wismer et al., 2005; pear – Jaeger et al., 2003b;). For apples, consumers tended to fall into two categories: those who preferred their fruit to be sweet and crunchy and those who preferred their apples to be acid and juicy (Dailliant-Spinnler et al., 1996). For kiwifruit, preference mapping identified a number of consumer segments which differed based on relative responses to the acid and grassy flavour typically associated with green-fleshed cultivars such as 'Hayward' and the sweet and tropical/berryfruit flavour typically associated with 'Hort16A' (Jaeger et al., 2003b; Wismer et al., 2005).

There is, however, a major limitation in the way preference mapping approaches are used to identify new product opportunities in fruit breeding. The product space is generally defined using existing cultivars and advanced selections, which represent a much constrained portion of the hypothetical product space. Cultivars and advanced selections are representative of fruit that have a bundle of attributes that combine in a way that confers commercial success or the expectation of commercial success. As an outcome of this commercial focus, genotypes (i.e. an individual seedling plant that arises from a cross between two parents) which, for example, might produce fruit that have high flavour but are compromised by poor storage or shelf life are unlikely to be selected. Furthermore, it is difficult for an individual seedling plant to produce sufficient fruit to use in large scale consumer preference studies.

The expansion from this 'constrained commercial product space' to the hypothetical product space could be envisaged by considering the impact on consumers' preferences of an increase in those volatiles that currently occur in sub-threshold

concentrations and/or at concentrations at which they may be suppressed by other flavour components of the fruit. A more extreme possibility is associated with the observation that some volatiles are present in flowers but not in the fruit, even though fruit develop from flowers. Should it be possible to get the biosynthetic pathways for these novel volatiles to function in fruit as well as flowers we might anticipate a range of new flavours.

Immaterial of whether or not these volatiles can be incorporated into using available biological technologies, the question remains as to extent that consumers will like the new and improved flavours? Anecdotally, we understand that this question has been addressed in consumer surveys, for example by asking the extent that consumers think they would like an apple with a tropical flavour? Consumer responses were very conservative suggesting that they preferred tradition flavours for apples over any novel flavour. This is perhaps not surprising, but perhaps emphasizes the importance of providing consumers with a product for tasting that represents the product developers expectation of the novel flavour. To do this we need to consider what model format are available in which it is possible to test consumer responses to novel flavours of apples?

There are at least three model systems that have been used to study the role of fruit volatiles/tastants on sensory perception and consumer references for flavour: model solutions or juices (Young et al., 1996; Ball et al., 1998), fruit pulps (Rossiter et al., 2000; Marsh et al., 2006), and, as proposed in the current study, injection of flavours into cubes of apple tissue. Both model juices and fruit pulps have a disadvantage in that they do not provide tasters with a realistic impression of the texture of the fruit. Texture is determined by the structure of fruit tissue (Harker et al., 1997), and two of the texture attributes, crispness and juiciness play a critical role in determining consumer preferences for apples (Daillant-Spinnler et al., 1996). More than this, the breakdown of fruit tissue during chewing determines flavour release (Harker and Johnston, 2008). There are a number of potential advantages in using a model in which flavour is incorporated into the real structure of apple tissue: (1) texture itself is a critical aspect of apple quality, (2) The ability to modify flavours in a more authentic context may improve ability of consumers to respond realistically to flavour stimuli than is model juices or pulps, and (3) in the best-case scenario, the tissue will break down and release flavour during chewing in way that is identical to that in a natural product.

In the current study, a model system for modifying the flavour of a real apple structure was developed. This involved injecting small volumes of flavourings into cubes of apple tissue. Having developed this model, we addressed a number of consumer issues: (1) how are consumer perceptions of flavour based on verbal descriptions related to their preferences after experiencing the flavour? (2) In what way does the novelty of the flavour (i.e. the disconnection between the flavour and the product context) influence perceptions and preferences? (3) Do personality traits associated with consumer responses to novel foods affect the answers to the previous questions? Overall we wanted to establish how successful the procedure for injecting volatiles into small pieces of apple was in providing consumers with insight into novel apple flavours.

2. Materials and methods.

Two studies were undertaken. The first considered how the concentration of volatiles injected into cubes of apple tissue influenced human perception of flavour intensity. This was done to establish an appropriate concentration of volatiles for use in subsequent consumer experiments. The second experiment explored how consumers reacted to the concept of novel flavours of apples (smoked salmon, chocolate, tropical, apple), and whether or not their reaction changed after tasting samples of apples with these flavours.

Plant material

Apples (cv. 'Sciros', marketed as Pacific Rose™) harvested in May 2007 were sourced from a commercial coolstore. 'Sciros' was selected on the basis that it is a sweet and low acid apple with good texture (Harker et al., 2005), and therefore avoided any risk that high levels of acidity might interfere with perception of flavour of injected volatiles. Small numbers of 'Braeburn' apples, which are firm, sweet and high acid fruit (Harker et al., 2005), were also tasted as part of the characterisation of consumer preferences of the range of flavours that occur in standard apple cultivars. The condition of 20-fruit samples of both 'Sciros' and 'Braeburn' apples were assessed using standard protocols for measuring firmness (puncture force), soluble solids concentration and titratable acidity (Harker et al., 2002a; Harker et al., 2002b). The quality characteristics of fruit used in this study are provided in Table 1.

Table 1. Quality parameters for ‘Braeburn’ and ‘Sciros’ apples.

	SSC (°Brix)	Acidity (g malic acid/L)	Firmness (kg)
Braeburn	13.1 ± 1.3	5.4 ± 0.9	7.1 ± 0.7
Sciros	13.0 ± 1.2	1.8 ± 0.4	5.8 ± 0.7

Volatile analysis

The flavour characteristics of the plant material was further characterised for ‘Sciros’ apples using standard GC-MS methodologies. A cube of apple tissue without skin (1cm x 1cm x 1cm) was placed in a 10 ml vial fitted with a silicone septum. The SPME fibre used was a 2cm long Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane 50/50 µm (DVB/CAR/PDMS), from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before use, the fibre was conditioned as recommended by the manufacturer. The fibre was exposed to the sample headspace for 10 minutes. Volatiles were determined using an HP 5890 gas chromatograph coupled to a VG-70SE mass spectrometer as follows: the fibre was thermally desorbed at 150-250 °C at 10 °C/sec for 20 min with splitless method onto a GC column [DB Wax (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness)] via a heated (210 °C) capillary interface. Column temperature was held at 35 °C for 2 min and increased at 5 °C/min to 100°C, at 8 °C/min to 150 °C and finally, at 10 °C/min to 220 °C, holding 15 min at 220 °C. The carrier gas was helium at 30 cm·s⁻¹ and the MS electron impact ionization was at 70eV with a scan range 30-320 atomic mass units. Component identification was assisted by reference to mass spectra of authentic standards (Wiley, NIST and in-house libraries) and GC retention indices. The volatile profile of the apple tissue prior to injection of novel volatiles is provided in Table 2.

Novel Flavours

Four commercial flavours (chocolate flavour, apple flavour, smoked salmon flavour and tropical flavour) were donated by Zymus International Ltd, Auckland, New Zealand. The volatile profiles of these flavourings were determined as follows: 1µl of a single compound was placed in a 10 ml vial fitted with a silicone septum. SPME fibres (as described in Section ‘Volatile analysis’) were exposed to the flavour headspace for 10 seconds. Volatiles desorbed from the SPME fibre and processed using an HP 5890

gas chromatograph coupled to a VG-70SE mass spectrometer as described in Section ‘Volatile analysis’.

There were 10, 4, 13 and 23 volatile compounds present in the tropical, smoked salmon, chocolate and apple flavours, respectively (Table 3). Each of these compounds was absent from the apple discs with the exception of 5 of the volatiles in the apple flavouring. Volatile profiles of flavours are available upon request.

Table 2. Aroma volatile compounds present in fresh Sciros apple cubes.

Compounds	R.T. (s)	CAS
1-Propyl acetate	380.189	109-60-4
2-Methyl-1-propyl acetate	434.411	110-19-0
Ethyl butanote	469.552	105-54-4
1-Butyl acetate	523.477	123-86-4
Hexanal	536.020	66-25-1
2-Methylbutyl acetate	596.429	624-41-9
Butyl propanoate	629.716	590-01-2
1-Butanol	655.785	71-36-3
1-Pentyl acetate	684.461	628-63-7
2-Methyl-1-butanol	750.585	137-32-6
Butyl butanote	759.406	109-21-7
Ethyl hexanoate	784.213	123-66-0
1-Hexyl acetate	851.107	142-92-7
2-Hexen-1-ol acetate	944.608	2497-18-9
1-Hexanol	978.848	111-27-3
Hexyl butanoate	1059.180	2639-63-6

Table 3. Number of volatile compounds present in the novel flavoured apple cubes.

Flavour	Total	Not present in apple disc
Apple disc	16	0
Tropical	10	10
Smoked salmon	4	4
Chocolate	13	13
Apple	23	18

Preparation of samples for tasting

Cubes of apple tissue (1cm x 1cm x 1cm) were cut from ‘Sciros’ apples. In each cube, we injected 1-3 μ l of the flavours using a glass syringe (Phenomenex P/N 002000 10F F07-C2307). The flavours (chocolate flavour, apple flavour, smoked salmon flavour and tropical flavour) provided by Zymus[®] were used without dilution. All cubes were presented to participants in small (35 ml) clear plastic cups, which labelled with three digit codes. Samples were presented in a randomized complete block design

balanced for order and carryover effects. All tasting was conducted under red lights in formal sensory booths described previously (Wismer et al., 2005) and filtered water and plain water crackers (Arnott's original, Arnott's Biscuits Ltd, Homebush, NSW, Australia) were provided as palate cleansers.

Experiment 1: perception of flavour intensity

Twenty participants were recruited from HortResearch staff not directly involved in the study. At the briefing prior to entering the sensory booths, the participants were given a cube of 'Sciros' apple tissue to taste as a reference for natural apple flavour as well as smelling the four unlabelled odours as a reference for novel flavours they would encounter during tasting. In the sensory booths, the participants assessed the flavour of a control apple cube and each of the four flavours injected into the cubes at three concentrations in a randomised complete block design. The concentrations were set up by injecting the apples cubes with 1, 2 and 3 μ l of flavour. After tasting each sample, participants were asked to score (1) the intensity of the natural apple flavour and (2) the intensity of the added flavour using separate labelled magnitude scales (LMS) (Green et al., 1993, 1996). They were also asked to provide comments about the flavours.

Experiment 2: Consumer evaluation of novel and familiar flavours

Fifty two consumers from the Auckland Region were recruited on the basis that they were regular consumers of apples (Table 4). None of the consumers were HortResearch staff or related to HortResearch staff, and all received NZ\$ 30 as an incentive/reimbursement for participating in the study.

The consumers answered questions that fell into three sections. In the first series of questions consumers were allocated in a discussion room where they were asked: (A) how much they like a range of different foods (chocolate, fish, apple and tropical fruits) using a 9 category hedonic scale from 'dislike extremely' to 'like extremely', (B) how often did they eat these foods using categories ~ once a day, ~ once a week, ~ once a month, less than once a month, never; (C) how appropriate is it to have a product or dish which combine pairs of ingredients (chocolate, fish, apple and tropical fruits) using a 7 category scale anchored at the extremes with 'never appropriate' and 'always appropriate' (Cardello & Schutz, 1996; Lahteenmaki & Tuorila, 1997); (D) a survey containing the eight-item VST scale used by Van Trijp et al. (1992a); moreover, (E) they were asked how much they would like and apple with a hint of chocolate, with a

hint of fish, with a hint of tropical and a more intense taste of apple using a 9 category hedonic scale from ‘dislike extremely’ to ‘like extremely’ afterwards they were asked how certainty they were in their answers using a scale (‘extremely uncertain’ to ‘extremely certain’) and finally they were asked if such an apple was available in the shops what would be their reaction, using the scale of Schutz (1965).

Table 4. Summary statistics of selected demographics (sample size 52).

Demographic	%
Gender	
Male	52
Female	48
Age	
18-29	34.6
30-45	34.6
>45	30.8
Ethnicity	
New Zealander	47.6
Maori	19.0
Tongan	1.6
Samoan	3.2
Indian	6.3
European	4.8
Other	17.5
Work hours	
Full time	55.8
Part time	32.7
Not in paid employment	11.5
Income in NZ\$	
25 000 or less	7.7
25 001-50 000	26.9
50 000-75 000	25.0
75 001-99 999	11.5
100 000 or more	5.8
Do not wish to answer	23.1

For the second series of questions, in the sensory booths, consumers were given one slice of ‘Sciros’ and another one of ‘Braeburn’ and they were asked (F) how much they like both using a 9 category hedonic scale from ‘dislike extremely’ to ‘like extremely’.

For the third series of questions, consumers were given one by one the flavoured apples. Once they received the sample, they were asked to put the whole piece of apple in their mouth and chew the sample completely before answer the questions. The first question was (G) how much they liked the sample using a 9 category hedonic scale from ‘dislike extremely’ to ‘like extremely’; (H) how certain they were in their answers

using a scale from ‘extremely uncertain’ to ‘extremely certain’; and (I) if the apple was available in the shops what would be their reaction using the scale of Schutz (1965). After tasting the sample the consumers were given another questionnaire where they were informed about the added flavour of the sample already tasted and they were asked (J) if the flavour was an authentic flavour; (K) if after tasting the sample, the concept of an apple with the new flavour made more sense for them and (L) if tasting the sample had given to them a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour. All these questions were answered using a five-point scale with all categories labelled, ranging from strongly disagree (=1) to strongly agree (=5).

3. Results and Discussion

Flavour intensity

Participants perceived the added flavours as being dominant over the natural flavour of the apple cubes with the exception of the Zymus[®] apple flavouring (Figure 1). Generally the natural apple flavour was scored as having an intensity of 2.02 to 3.01 which equates to moderate intensity. The perceived intensities of added flavours chocolate, smoked salmon and tropical were 5.75-6.87, 5.67-6.42, 5.98-7.47 (~ strong to very strong), respectively (Figure 1A). On the contrary, the intensity perceived by the added flavour of apple was scored between 3.02 to 3.36 described between moderate and strong which was lower than the natural perceived flavour averaged 4.73. Increasing the volume of flavouring injected into the tissue cubes did not markedly increase the perceived intensity of the novel flavour except for chocolate and tropical flavour for the 3 μ L volume (Figure 1B) However, panellist described that volume inside the tissue for both flavours as very artificial taste, a bit chemical and high strong aroma. For this reason it was decided to continue research with a single treatment which involved injecting 1 μ l of flavouring into the cubes.

Attitudes to selected flavours and combinations of flavour

In order to understand pre-existing consumer opinions relating to the various flavours a series of questions were asked about (1) liking of the various flavours, (2) regularity with which foods with the various flavours were consumed and (3) appropriateness of combining flavours. Consumer liking scores for all foods varied from 7 to 8, which corresponds to like moderately and like very much in the 9 point

hedonic. However, foods with apple and chocolate flavour were preferred over those with fish flavour (Table 5). Apples were the most frequently consumed product with an average consumption score of 4.48, which suggests they were eaten somewhere between once a week and once a day (Table 5). The other products were eaten by consumers once a month or once a week and no significant differences were observed between them (salmon, chocolate and tropical fruits).

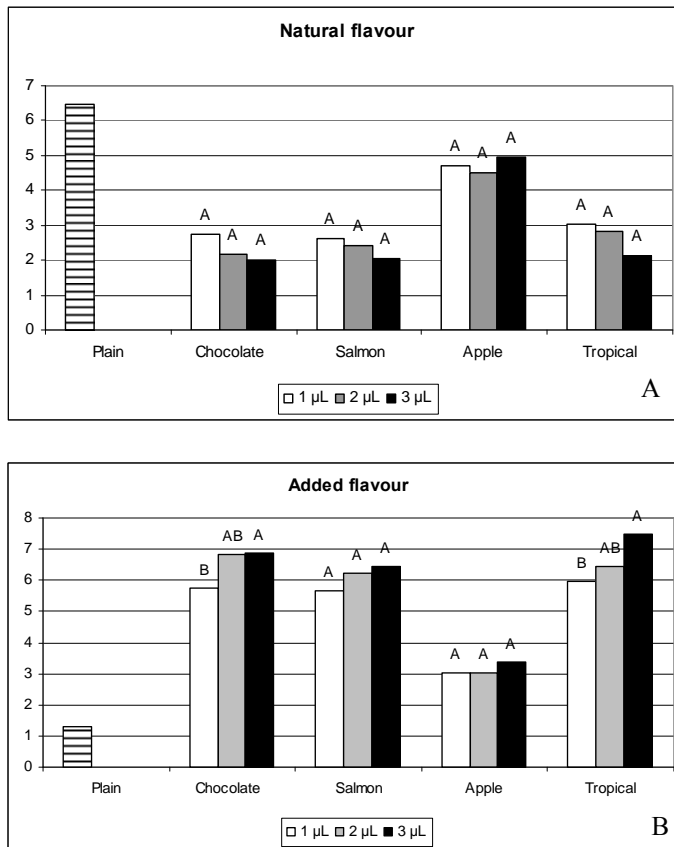


Figure 1. Intensity of the natural apple flavour and added flavour on samples injected with 1, 2 or 3 µL of the flavour essences. Means followed by different capital letters for each flavour essence are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Consumers responses to questions on the appropriateness of various combinations of flavour provided that seem to have good face validity. The combination of the two fruit flavours (apple and tropical) was perceived as the most appropriated combination (Table 5). This was followed by the combination of either of the fruits with chocolate, although the combination of tropical fruit and chocolate was perceived as the more

appropriate of the two combinations. Flavour combinations which included fish were seen to be less appropriate than any of the other flavour combination, but fish and tropical fruit was perceived as a more appropriate combination than fish and chocolate or fish and apple, which were not significantly different from each other (Table 5). The use of appropriateness scales helps to assist in early screening, identification and tailoring of products for better market positioning, and/or improved targeting to specific consumer segments (Cardello and Schutz, 1996).

Table 5. Consumer liking scores, frequency of consumption and questions on appropriateness of various combinations of the tested flavours.

		Scores	
1. How much do you like __ or foods that include __ as an ingredient? scale (1-9)	Chocolate	7.96	A
	Fish	7.25	B
	Apple	7.81	A
	Tropical fruit	7.67	AB
2. How often do you eat __? scale (1-5)	Chocolate	3.85	B
	Fish	3.77	B
	Apple	4.48	A
	Tropical fruit	3.65	B
3. How appropriate is to combine __? scale (1-7)	Apple & Fish	1.96	E
	Apple & Chocolate	4.15	C
	Apple & Tropical	5.80	A
	Fish & Chocolate	1.60	E
	Fish & Tropical	2.67	D
	Chocolate & Tropical	4.92	B

Means followed by different capital letters for each question are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Changes in opinions after tasting

Consumer expectations as to the probable experience associated with novel flavours of apples evoked strong responses. Prior to tasting and among the four different proposed flavours, consumers most preferred option was for a more intense apple flavour, closely followed by apples with a tropical flavour. Consumer expectations of chocolate flavoured apples lead to scores of ~6.5, indicating that this flavour was liked but not as much as traditional fruit flavours. The least preferred option was for the smoked salmon flavoured apple, which received scores suggested that this flavour would be disliked (Figure 2). However, after tasting the sample and among the different flavours, the same pattern was observed. However, if we discern for each individual flavour, differences were found between before and after tasting. Consumers becoming

less satisfied with the more intense apple flavour, although liking of tropical flavoured apples did not change (Figure 2). Liking for chocolate flavoured apples declined after tasting the samples – this could be due to the artificial taste that most consumers mentioned on the chocolate flavouring. There was a small, but non-significant increase in the average liking of smoked salmon flavoured apples (Figure 2), which came about as the result of 7 consumers changing their scores from 1 (‘dislike extremely’) to higher scores (data not presented). For all flavours, except apple, allowing consumers to taste the novel apple concept significantly increased the certainty with which they provided their answers. This can help to understand human responses to fresh fruit, and to determine the relative impact of different flavour components (Marsh et al., 2006).

As might have been anticipated, there was a relatively close relation between liking of flavour and consumption intention (data not shown). Prior to tasting, relationships between liking and consumption intentions provided R^2 values of 0.55, 0.79, 0.54, 0.57 for chocolate, fish, tropical and apple, respectively. These relationships between liking and consumption became closely aligned after tasting the apple cubes with R^2 values increasing to 0.78, 0.75, 0.70 and 0.63 for chocolate, fish, tropical and apple, respectively.

Evaluation of affect of the flavour experience

It was clearly demonstrated that the tasting of flavoured apple cubes elicited a change in participants’ perceptions of liking and likelihood of consumption of novel flavours (Figure 2). Further information on the value to consumers of having an opportunity to taste novel-flavoured apple cubes was solicited a series of questions: (1) if the flavour was an authentic flavour; (2) if after tasting the sample, the concept of an apple with the new flavour made more sense for them and (3) if tasting the sample had given to them a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour.

Tropical flavoured apple cubes were considered to have the most authentic flavour (83% agreement), followed by more intense apple (58% agreement) and chocolate (50% agreement) with smoked salmon flavoured apples being perceived as having the least authentic flavour (42% agreement). The way the question was phrased drew the participants’ attention to whether or not the flavour was a true to type. There are two factors that seemed to influence flavour in this respect: (1) the quality of the flavour in itself and (2) the interaction of the flavouring with the apple fruit matrix. The second of

these factors could involve chemical interactions between the sugars and acids in the tissue and the volatiles components of the injected flavouring (Friel et al., 2000; Marsh et al., 2006) as well as through physiological interactions in the mouth, for example enhancement, synergy and suppression of odour as occurs with some mixtures of compounds (Meilgaard et al., 2007).

With the exception of smoked salmon flavoured apple, 50% or more of participants agreed that the concepts of novel flavoured apples made more sense after tasting them. On reflection this question did not provide great insight – flavours that were not liked didn't make sense (e.g. smoked salmon) while flavours that were liked did make sense (e.g. tropical). However, there was universal agreement (88%, 73%, 71% and 65% for tropical, chocolate, apple and smoked salmon, respectively) that the tasting of samples provided participants with a good indication of what it would be like to eat a whole apple with any particular novel flavour.

The average scores for consumer responses to the three questions are presented in Figure 3. There was a clear pattern suggesting that the tropical flavoured apple concept provided consumers with an experience that was authentic, made sense and consequently, provided a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour. As a comparison, the chocolate and salmon flavoured apples did not provide as authentic a flavour, the concept didn't make sense, but even so, the experience provided consumers a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour.

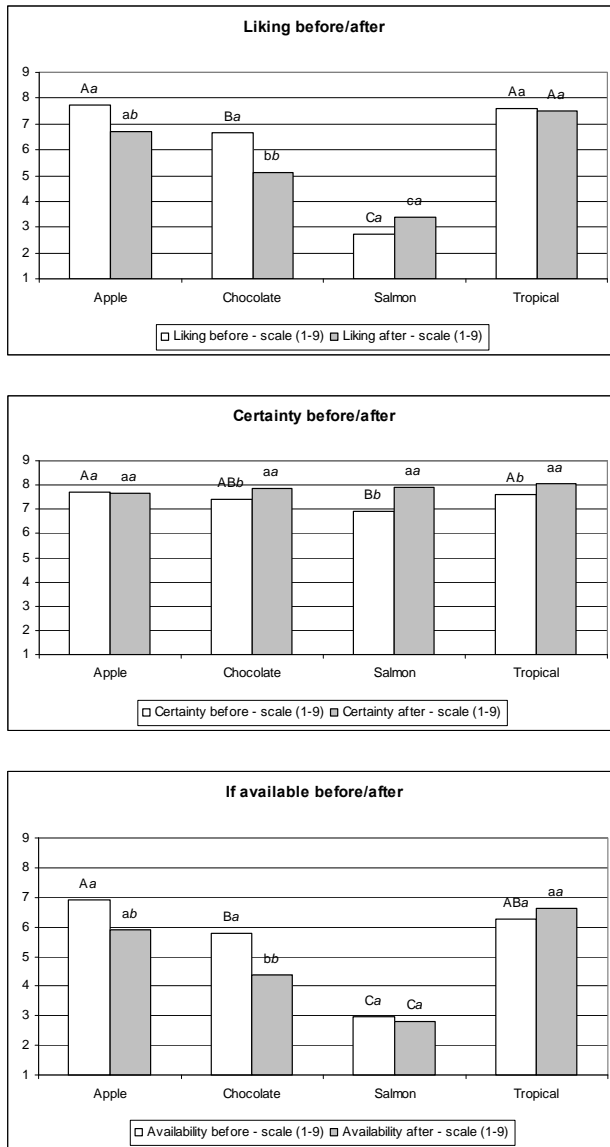


Figure 2. Consumer liking, certainty of answers on liking and consumption intention before and after tasting of novel apple flavours. Means followed by different capital letters show significant differences between the novel flavours before tasting at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different small letters show significant differences between the novel flavours after tasting at $P \leq 0.05$ (LSD test). Means followed by different italicised letters show significant differences for each flavour before and after tasting at $P \leq 0.05$ (LSD test).

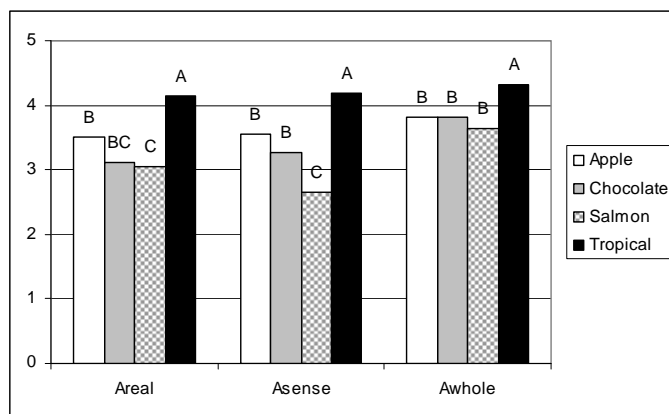


Figure 3. The extent that consumers perceived apple samples to provide an authentic example of the novel flavour (Areal), that new flavour made sense (Asense), and provided a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour (Awhole). Means followed by different capital letters for each parameter (Areal, A sense and Awhole) are significantly different at $P \leq 0.05$ (LSD test).

Influence of the trait for food variety seeking behaviour on consumer responses?

It is well known that consumer acceptance is crucial to the development of successful food products (McFie, 2007). Consumers vary in the way they respond to previously unknown foods. These responses can be quantified using two tools: (1) the food neophobia questionnaire (fear of new foods; Pliner and Hobden, 1992) and variety seeking behaviour questionnaire (Van Trijp and Steenkamp, 1992a). Food neophobia is defined as a rejection and/or reluctance to eat unfamiliar food (Loewen and Pliner, 2000). In our research, we have found that food-related behaviours as observed in experimental settings seem to be more closely related to participants responses to the variety seeking questionnaire (Jaeger and Harker, 2005). The variety seeking questionnaire requires participants to indicate their level of agreement with statements such as: “When I eat out, I like to try the most unusual items, even if I’m not sure I would like them” and “I am curious about food products I am not familiar with” (Van Trijp and Steenkamp, 1992a).

In the current study, the variety seeking scale provided internally reliable data with Cronbach’s coefficient $\alpha = 0.86$. Principal component analysis indicated 53% variability was accounted in the first dimension and 11% of variability by the second dimension (data not shown). Given this result, the sum of the responses to all variety seeking questions were calculated for each consumer (these were highly correlated with

location of participants along the first dimension of the PCA, $r = 0.996$). Consumers were then separated into a group of 26 consumers with lower VST scores (17 to 31) and a group of 26 consumers with higher VST scores (32 to 40). For high and low VST consumer segments, flavour liking and consumption intention for specific flavour concepts followed similar trends, and therefore only data for flavour liking are presented (Table 6). The overall implication is that high VST consumers tend to provide higher liking scores than low VST consumers for a range of novel flavour opportunities. Previous studies also demonstrates the influence of VST on food-related behaviour and supplements other findings regarding the usefulness of this personality trait in explaining food choices (Van Trijp et al., 1992b; Jaeger and Harker, 2005)

Table 6. Influence of variety seeking behaviour (VST) on liking scores for novel flavours of apples. The VST segments were Low (VST scores 17 to 31, $n=26$) and High (VST scores 32 to 40, $n=26$).

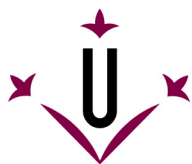
Novel flavour	Before/after tasting	VST Segment		P
		Low	High	
Apple	Before	7.3	8.2	0.05
	After	6.7	6.7	<i>ns</i>
	Change	-0.6	-1.5	<i>ns</i>
	P (Change)	<i>ns</i>	0.0007	
Chocolate	Before	6.7	6.6	<i>ns</i>
	After	4.5	5.7	0.026
	Change	-2.2	-0.6	0.008
	P (Change)	<0.0001	<i>ns</i>	
Salmon	Before	2.1	3.4	0.005
	After	2.7	4.1	0.013
	Change	0.6	0.7	<i>ns</i>
	P (Change)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Tropical	Before	7.2	8.0	<i>ns</i>
	After	7.6	7.4	<i>ns</i>
	Change	0.4	-0.3	<i>ns</i>
	P (Change)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

As a conclusion, the study demonstrated that the injection of volatiles/essences into pieces of apple tissue was a useful model for exploring consumer preferences for novel flavours. Overall consumers agreed or agreed strongly with the statement that provision of samples representing the flavour concepts provided a good indication of what it would be like to eat a whole apple with that flavour.

4. References

- Anon.** 2005. State of the plate 2005: Study on America's consumption of fruits and vegetables. Produce for better Health Foundation: Wilmington, DE, USA.
- Ball, R. D.; Murray, S. H.; Young, H.; Gilbert, J. M.** 1998. Statistical analysis relating analytical and consumer panel assessments of kiwifruit flavour compounds in a model juice base. *Food Quality and Preference*, 9, 255-266.
- Cardello, A. V.; Schutz, H. G.** 1996. Food appropriateness measures as an adjunct to consumer preference/acceptability evaluation. *Food Quality and Preference*, 7, 239-249.
- Dailant-Spinnler, B.; MacFie, H. J. H.; Beyts, P. K.; Hedderley, D.** 1996. Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. *Food Quality and Preference*, 7, 113-126.
- Friel, E. N.; Linforth, R. S. T.; Taylor, A. J.** 2000. An empirical model to predict the headspace concentration of volatile compounds above solutions containing sucrose. *Food Chemistry*, 71, 309-317.
- Green, B. G.; Shaffer, G. S.; Gilmore, M. M.** 1993. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chemical Senses*, 18, 683-702.
- Green, B. G.; Dalton, P.; Cowart, B.; Shaffer, G.; Rankin, K.; Higgins, J.** 1996. Evaluating the 'Labeled magnitude scale' for measuring sensations of taste and smell. *Chemical Senses*, 21, 323-334.
- Harker, F. R.; Redgwell, R. J.; Hallett, I.C.; Murray, S. H.; Carter, G.** 1997. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews*, 20, 121-224.
- Harker, F. R.; Maindonald, J.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Hallett, I. C.; Walker, S. B.** 2002a. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Harker, F. R.; Marsh, K.B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F. A.; Walker, S. B.** 2002b. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: Sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 241-250.
- Harker, F. R.; Jaeger, S. R.; Gamble, J.; Richardson-Harman, N.** 2005. Consumer acceptance of new horticultural crops. *The Compact Fruit Tree*, 38, 26-30.
- Harker, F. R.; Jaeger, S.R.; Lau, K.; Rossiter, K.** 2007. Consumer perceptions and preferences for kiwifruit: a review. *Acta Horticulturae*, 753, 81-88.
- Harker, F. R.; Johnston, J. W.** 2008. Importance of texture in fruit and its interaction with flavour. In *Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, England; pp. 132-149.
- Jaeger, S. R.; Rossiter, K. L.; Wismer, W. V.; Harker, F. R.** 2003a. Consumer-driven product development in the kiwifruit industry. *Food Quality and Preference*, 14, 187-198.

- Jaeger, S. R.; Lund, C. M.; Lau, K.; Harker, F. R.** 2003b. In search of the “ideal” pear (pyrus spp.): results of a multidisciplinary exploration. *Journal of Food Science*, 68, 1108-1117.
- Jaeger, S. R.; Harker, F. R.** 2005. Consumer evaluation of novel kiwifruit: willingness-to-pay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2519-2526.
- Lahteenmaki, L.; Tuorila, H.** 1997. Item-by-use appropriateness of drinks varying in sweetener and fat content. *Food Quality and Preference*, 8, 85-90.
- Loewen, R.; Pliner, P.** 2000. The Food Situations Questionnaire: A measure of children’s willingness to try novel foods in stimulating and non-stimulating situations. *Appetite*, 35, 239-250.
- Marsh, K. B.; Friel, E. N.; Gunson, A.; Lund, C.; MacRae, E.** 2006. Perception of flavour in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars. *Food Quality and Preference*, 17, 376–386.
- McFie, H.** 2007. *Consumer-led food product development*. Woodhead: Cambridge, U.K.
- Meilgaard, M. C. ; Civille, G. V. ; Carr, B. T.** 2007. *Sensory evaluation techniques*. 4th Edition. CRC Press, Boca Raton. pp 448.
- Pliner, P.; Hobden, K.** 1992. Development of a scale to measure the trait of food neophobia in humans. *Appetite*, 19, 105-120.
- Rossiter, K. L.; Young, H.; Walker, S. B.; Miller, M.; Dawson, D. M.** 2000. Effect of sugars and acids on consumer acceptability of kiwifruit. *Journal of Sensory Studies*, 15, 241-250.
- Van Trijp, H. M.; Steenkamp, B. E. M.** 1992a. Consumers’ variety seeking tendency with respect to foods measurement and managerial implications. *European Review of Agricultural Economics*, 19, 181-195.
- Van Trijp, H. C. M.; Lahteenmaki, L.; Tuorila, H.** 1992b. Variety seeking in the consumption of spread and cheese. *Appetite*, 18, 155-164.
- Wismer, W. V.; Harker, F. R.; Gunson, F. A.; Rossiter, K. L.; Lau, K.; Seal, A. G.; Lowe, R. G.; Beatson, R.** 2005. Identifying flavour targets for fruit breeding: a kiwifruit example. *Euphytica*, 141, 93-104.
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** 1996. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 329-336.



Universitat de Lleida



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria



RECERCA | TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIES