

EL ANÁLISIS DEL AROMA DE LA CERVEZA

RICARDO LÓPEZ, JUAN CACHO, VICENTE FERREIRA

LABORATORIO DE ANÁLISIS DEL AROMA Y ENOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y ANALÍTICA, FACULTAD DE CIENCIAS, ARAGÓN INSTITUTE OF ENGINEERING RESEARCH I3A, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

1. Introducción

El aroma de la cerveza se encuentra entre los más complejos que existen en la naturaleza por diversas razones. En primer lugar, por el gran número de sustancias volátiles que se encuentran formando parte de su composición química, en segundo lugar por la naturaleza cambiante de dicha composición debida a la propia evolución de la cerveza, en tercer lugar por la gran variedad de cervezas que podemos encontrar, y por último porque, en la mayor parte de las cervezas, su aroma característico no es debido a un compuesto impactante, sino a la acción de varios componentes químicos actuando conjuntamente.

El objetivo de este artículo es mostrar la secuencia operativa que la Química del Aroma plantea cuando pretende elucidar químicamente la naturaleza de la percepción olfativa. Esta secuencia servirá como guía para mostrar los conocimientos actuales sobre el análisis del aroma de la cerveza, incidiendo en las posibilidades disponibles y presentando también las dificultades asociadas al análisis.

2. Buscando las moléculas del aroma

La primera etapa en la elucidación del aroma de un producto es la identificación de los compuestos que son capaces de contribuir a la sensación organoléptica que perciben nuestros sentidos. Esto no es una tarea fácil, en el caso particular del aroma de la cerveza existen cientos de compuestos volátiles [1], pero sólo una pequeña fracción de ellos son relevantes para la percepción sensorial. Puesto que todas las moléculas del aroma son más o menos volátiles, la técnica que *a priori* es más adecuada para cribar los volátiles aromáticamente activos del resto de moléculas, es la Cromatografía Gas con detección Olfatométrica (GC-O). Esta técnica utiliza la nariz humana como detector para los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica (Figura 1), normalmente una columna capilar de sílice fundida [2]. Existen diferentes versiones en la forma en que la señal es registrada y procesada en la GC-O, pero los resultados normalmente dependen más de cómo se ha preparado la muestra que del tipo de señal obtenida. En este sentido es fundamental tener en cuenta que el éxito de esta operación dependerá principalmente de que la muestra sea representativa del aroma que queremos estudiar y también que la preparación de la muestra previa a la GC-O mantenga dicha "representatividad". Hablando de forma general, el propósito fundamental de la GC-O es listar y jerarquizar los aromas presentes en la matriz de acuerdo con su potencial importancia en el aroma del producto. Es importante destacar que se trata de una lista de "potenciales" contribuyentes al aroma, ya que dicha importancia deberá ser

comprobada posteriormente mediante estudios de reconstitución del aroma mediante combinaciones de los odorantes encontrados con la GC-O.

La primera aproximación de forma sistemática a la evaluación sensorial de la contribución de los diferentes volátiles individuales al aroma de la cerveza fue realizada por Meilgaard hace 35 años [3, 4]. En dicho estudio calculó los valores de actividad de aroma (OAVs: concentración dividida entre umbral de olfacción) de 239 constituyentes de la cerveza en función de datos cuantitativos y umbrales de olfacción determinados en cerveza. Los resultados indicaron que, aparte del etanol y el dióxido de carbono, varios ésteres (p.ej. acetato de isoamilo y hexanoato de etilo), alcoholes superiores (p.ej. alcohol isoamílico), diaquil sulfuros (p. ej. dimetil sulfuro), y ácidos grasos de cadena corta (p.ej. ácido butanoico) eran esenciales para el aroma de las cervezas norteamericanas tipo lager.

En un estudio del aroma de una cerveza pale lager Bávara, Schieberle [5] encontró que entre los 22 odorantes identificados, la β -damascenona mostraba la actividad odorante más intensa. Otros compuestos encontrados que tenían altos OAVs eran butirato de etilo, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo y 2-feniletanol, lo cual sugería que eran compuestos importantes para el aroma. Comparando con la cerveza pale lager, el OAV del furaneol (olor a azúcar quemada) en una cerveza negra y el OAV del 4-vinilguaiacol (olor a clavo) de una cerveza de trigo eran significativamente más altos. El autor atribuyó a estos odorantes la diferencia en aromas entre estos tipos de cervezas [5]. En 2002 Gijs aplicó la GC-O a un extracto preparado con cervezas lager comerciales, confirmando la importancia del 2-feniletanol, y sugiriendo que el 3-metil-2-buten-1-tiol (MBT), dimetil trisulfuro y o aminoacetofenona eran igualmente compuestos clave en el aroma de la cerveza [6].

En 2005, Schieberle aplicó de nuevo la técnica, en este caso al aroma de una cerveza Bávara tipo pilsner. En esta ocasión la GC-O encontró 40 odorantes, entre los cuales octanoato de etilo, β -damascenona, ácido isovaleriánico y furaneol mostraron la mayor intensidad [7]. También en 2005, Guyot-Declerck utilizó la GC-O para estudiar la influencia del pH y el envejecimiento en las propiedades organolépticas. Sus conclusiones fueron que a pH más alto del normal, la aparición de notas tipo "cartón" era menos intensa con el envejecimiento, aumentaba la nota "coco" y no había cambios respecto a la nota "coliflor" [8]. En 2006, Vermueulen y colaboradores aplicaron la GCO para evaluar la presencia de los tioles polifuncionales en cervezas lager recién preparadas reportando 11 tioles polifuncionales, 6 de ellos identificados por primera vez en la cerveza [9]. Más recientemente, Bravo y colaboradores han aplicado la GC-O al

estudio de la formación -dicarbonilos durante el almacenamiento de cervezas pilsner. Mediante el uso de la GC-O encontraron que el envejecimiento forzado de la cerveza provocaba un aumento en las cantidades de fura-neol, E-2-nonenal y fenilacetaldehído [10].

También se ha aplicado la GC-O para estudiar la contribución aromática del lúpulo al carácter de la cerveza. Sánchez y colaboradores compararon los volátiles aromáticamente activos en cervezas con y sin lúpulo usando GC-O. Los siguientes compuestos se percibieron más intensamente en el puerto de olfacción en las cervezas con lúpulo que en las sin lúpulo: linalool, citroneol, acetato de 2-feniletilo y 2-feniletanol [11]. En un estudio con cervezas preparadas usando dos lúpulos diferentes, Lermusieau publicó que, en particular, 2-metil-3-furantiol, dimetil trisulfuro, linalool, γ -nonalactona, β -damascenona, etil cinamato, humuladienona, y algunos compuestos sin identificar mostraban una intensidad superior en GC-O en la cerveza producida con lúpulo Saazer [12]. Los mismos autores encontraron que el lúpulo Challenger era parcialmente responsable de un mal olor encontrado en la correspondiente cerveza. En un estudio similar pero con otros lúpulos, Kishimoto encontró 27 odorantes en la cerveza relacionados con el lúpulo. De estos los más importantes por su intensidad fueron linalool, geraniol, 2-metilbutirato de etilo, 3-metilbutirato de etilo e isobutirato de etilo [13]. En un estudio más selectivo para encontrar el compuesto responsable del carácter “especiado” de algunos lúpulos, Marriot localizó mediante GC-O un olor que posteriormente identificó como 14-hidroxi- β -cariofileno [14].

Igualmente, el grupo de Schieberle comparó mediante GC-O el aroma de cinco lúpulos diferentes. El estudio reveló que linalool y mirceno estaban presentes en todos los extractos de lúpulo en mayor intensidad, seguidos por 2-isopropil-3-metoxipirazina, ácido isovaleriano y geraniol. Lo que es más interesante del estudio es que algunos compuestos alcanzaron intensidades altas sólo en ciertos lúpulos. Por ejemplo, (5Z)-octa-1,5-dien-3-ona y germacreno B en Hersbrucker Spät, (3E,5Z)-undeca-1,3,5-trieno en Hersbrucker Spät y Cascade, y nonal en Cascade [15].

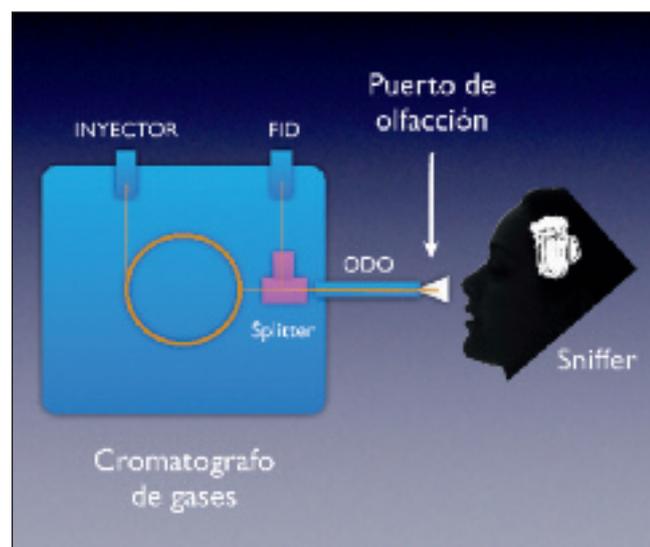


Figura 1. Sistema GC-O.

3. Técnicas para el aislamiento e identificación de las moléculas del aroma

El resultado del proceso de criba de la GC-O son listas jerárquicas de zonas odorantes ordenadas por su importancia sensorial potencial en función de la intensidad de olor registrada. En este punto del análisis, la única identidad que se tiene es la naturaleza del olor y su tiempo de retención. El siguiente paso es identificar el compuesto químico responsable del olor de cada zona odorante. A continuación se plantea un esquema general que permite elucidar la naturaleza química de los odorantes.

1. Estandarización de los tiempos de retención. Los tiempos de retención de las zonas odorantes son normalizados en función de los tiempos de una serie de n-alcenos utilizados como estándares. Estos valores se denominan Índices de Retención Lineal (LRI) y su gran utilidad se fundamenta en que permiten una comparación de tiempos de retención entre compuestos cromatografiados en diferentes sistemas [16]. La comparación de los LRIs de los odorantes obtenidos por GC-O con los LRIs tabulados en las diferentes bases de datos permite la identificación tentativa en muchos de los casos.
2. Cromatografiar los extractos en un sistema de Cromatografía Gas con detección mediante Espectrometría de Masas (GC-MS) en modo barrido, utilizando una columna similar a la utilizada en el experimento de GC-O.
3. Compilar y cotejar los datos de espectros de masas, LRIs y naturaleza del odorante buscando coincidencias en las tres categorías. De aquí se obtiene una lista de candidatos para cada zona odorantes.
4. Confirmación de los candidatos. Para ello se necesita la inyección del patrón puro en los sistemas GC-O y GC-MS. La similitud en intensidad y calidad del olor, así como el espectro de masas deben ser los criterios de confirmación.

Después de este proceso, la identidad de la mayor parte de los odorantes estará confirmada satisfactoriamente. Sin embargo, algunos de los odorantes más importantes de la cerveza pertenecen a la categoría de compuestos difíciles de analizar (compuestos en concentraciones del orden de los ng/L o poco estables químicamente) y por tanto requerirán un mayor esfuerzo para la identificación. En este punto caben dos posibilidades, que no son excluyentes, invertir más tiempo en la preparación de muestra (realizar fraccionamientos, seleccionar técnicas más adecuadas para familias específicas) o utilizar la cromatografía gas multidimensional (MDGG) para aumentar la capacidad de separación de nuestro sistema.

La propiedad que define la cromatografía gas multidimensional es el requerimiento de que todos los analitos de interés sean sometidos a dos etapas de separación independientes y que los analitos permanezcan separados hasta que se complete todo el análisis. Esencialmente, lo que esto significa es que el efluente de la primera columna cromatográfica es reanalizado por una segunda columna con un fase estacionaria de diferente selectividad. En el caso de la cromatografía gas multidimensional convencional o *heart-cut* (GC-GC) sólo parte del efluente de la

primera columna es cromatografiado en la segunda, mientras que en la cromatografía gas multidimensional comprensiva o completa (GCxGC) todo el efluente de la primera columna es cromatografiado en la segunda.

En la Figura 2 puede observarse la configuración básica instrumental para llevar a cabo la GC-GC, consiste en un sistema cromatográfico compuesto de dos hornos independientes, cada horno con una de las columnas analíticas, y varios detectores. La configuración típica, es un detector FID en el primer horno y un espectrómetro de masas en el segundo cromatógrafo. También es conveniente para una mayor seguridad en la identificación de olores, añadir puertos de olfacción al final de las dos columnas. La pieza clave del sistema es el dispositivo que permite la conexión de las dos columnas. En el caso más habitual se trata de una válvula tipo Deans [17], que mediante el control de los flujos y presiones del sistema permite el envío selectivo de fracciones de efluente desde la primera hacia la segunda columna. También puede ser necesario, según las configuraciones, un punto de criofocalización al inicio de la segunda columna para favorecer el estrechamiento de las bandas cromatográficas.

Son escasos los autores que han aplicado la GC-GC a la cerveza. En 1999, se utilizó esta técnica para el seguimiento de la evolución de ciertos compuestos ligados al envejecimiento [18]. Un año más tarde, Sakuma y colaboradores la aplicaron a la identificación de defectos olfativos en la cerveza y materiales empleados para elaborarla. Con esta técnica pudieron concluir que un olor a desinfectante era provocado por el 2,6-diclorofenol [19]. Más recientemente, Lusk aplicando la MDGC ha propuesto dos compuestos, no descritos previamente en la cerveza, con aromas similares a los provocados por el MBT [20]. En 2010, Sasamoto ha propuesto un nuevo sistema GCGC de fácil configuración en el que demuestra las posibilidades de esta técnica en la cerveza con la identificación y cuantificación de la β -damascenona en cerveza [21].

Una evolución lógica de la GC-GC es la GCxGC. Como se ha comentado más arriba, la GCxGC implica que todo el efluente de la primera columna sea cromatografiado en la segunda. Sin embargo, unir simplemente las dos columnas no es suficiente para conseguir la separación deseada, ya que en realidad equivaldría a mezclar las fases estacionarias. Para que el acoplamiento suponga realmente un incremento en la capacidad de separación se debe incorporar un sistema modulador entre las dos columnas que permita el aislamiento de zonas del efluente de la columna 1 y el paso posterior a la columna 2. Este modulador es la pieza clave de un sistema GCxGC (Figura 3). A medida que la tecnología maduraba el modulador ha ido evolucionando a sistemas más robustos como los disponibles comercialmente a día de hoy, que en su mayor parte se basan en sistemas de criofocalización doble [22]. La separación puede realizarse en único horno cromatográfico ya que la segunda columna es una columna ultrarrápida. Otro punto de vital importancia para realizar una separación GCxGC con éxito, es que las fases estacionarias de las dos columnas sean lo más diferentes posible para conseguir la máxima separación. Si estos requisitos se cumplen, en teoría, la capacidad de separación del sistema se multiplica y pasamos a obtener un cromatograma tridimensional (o incluso cuadrimensional si se emplea un espectrómetro

de masas como detector). La desventaja en este caso es que esta técnica no es adecuada para combinarla directamente con la olfatometría por ser los picos cromatográficos demasiado rápidos.

La potencia de la GCxGC también ha sido aplicada al aroma de la cerveza. En nuestro conocimiento existen dos publicaciones, ambas sobre el aceite esencial de lúpulo. En 2004, Roberts y colaboradores desarrollaron un método basado en GCxGCTOF-MS para evaluar el perfil de los compuestos volátiles en el aceite esencial. Pudieron identificar 119 componentes, 45 de ellos por primera vez, demostrando la gran habilidad de esta técnica para separar y caracterizar muestras altamente complejas [23]. La otra publicación fue comentada al hablar de la GC-O en el apartado 2, ya que se trataba de una investigación más selectiva dirigida a la identificación de los compuestos responsables de las notas maderizadas [14]. En este caso la combinación de GC-O, GCGC y GCxGC con la espectrometría de masas permitió asignar dichas notas al ya mencionado 14-hidroxi- β -cariofileno. Otros compuestos importantes identificados fueron geraniol, linalool, β -ionona y eugenol.

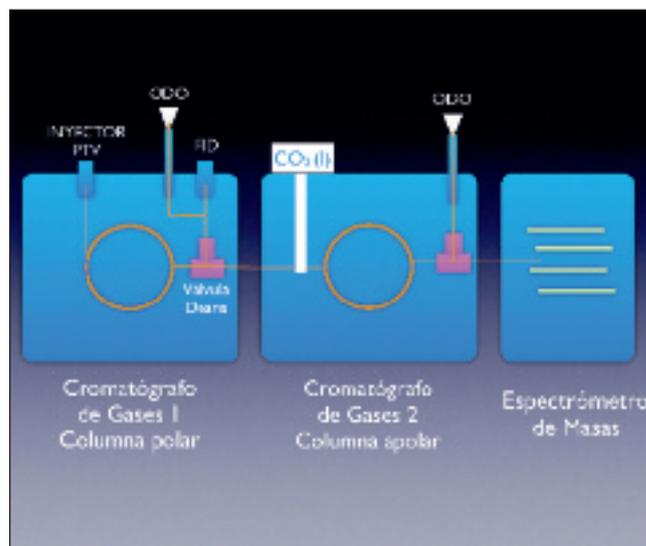


Figura 2. Configuración instrumental de un sistema GC-GC.

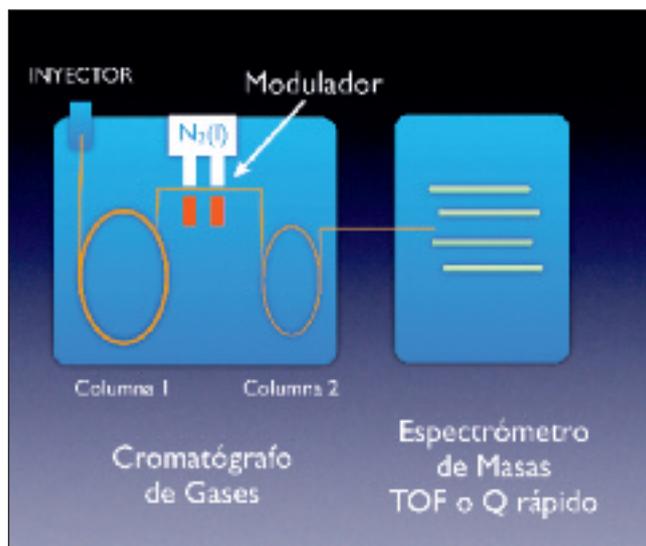


Figura 3. Configuración instrumental de un sistema GCxGC.

4. Determinación cuantitativa de los odorantes de la cerveza

La siguiente etapa en el proceso de estudio del aroma es la determinación de la concentración en la que se encuentran los odorantes identificados en la etapa anterior. Dados los diferentes niveles de concentración en los que los se encuentran en la cerveza los odorantes activos, es completamente necesario utilizar un variado conjunto de métodos analíticos para su determinación. Los volátiles mayoritarios (concentraciones superiores a 0,2 mg/L), tales como alcoholes de fusel, ácidos grasos y sus etil ésteres, pueden ser determinados directamente por GC-FID empleando diversas técnicas de preconcentración como la inyección directa, microextracción con un solvente, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), espacio de cabeza dinámico (DHS) o microextracción en fase sólida (SMPE). Los volátiles minoritarios (aquellos cuya concentración se encuentra entre 0,2 mg/L y 0,05 mg/L) también pueden determinarse mediante GC-MS utilizando una serie de técnicas de preparación de muestra similar. Los resultados que se obtienen con las diferentes técnicas de preparación de muestra difieren en el rango de analitos analizables con suficiente fiabilidad y en el nivel de automatización del método. Con este último criterio, las técnicas sin solvente completamente automatizadas como la SBSE, SPME o las más recientes basadas en sorbentes en agujas (Needle Trap, ITEX, Magic Needle), presentan innegables ventajas, ya que son muy fáciles de usar y relativamente baratas. Sin embargo, desde el punto de vista del rango de analitos analizables, no pueden competir hoy en día con las amplias posibilidades de la extracción en fase sólida (SPE). Las técnicas basadas en el espacio de cabeza fallan en el análisis de compuestos menos volátiles, y la SBSE en su actual formato, también tiene problemas extrayendo adecuadamente algunos compuestos polares.

Sin embargo, no es el análisis de los volátiles minoritarios el que todavía presenta dificultades. Con el nivel de sensibilidad y automatización de las técnicas analíticas, la determinación de muchos odorantes al nivel de los $\mu\text{g/L}$ es relativamente simple. La dificultad aparece cuando los analitos de interés no pueden ser determinados fácilmente utilizando una preconcentración no selectiva. Esto ocurre cuando los analitos son difíciles de extraer debido a que son muy polares o no muy volátiles (o ambas cosas), o cuando se encuentran en concentraciones muy bajas. El nivel de concentración al que el análisis de un compuesto volátil se convierte en difícil está relacionado con su polaridad y con la calidad de su espectro de masas. Por ejemplo, el análisis de 2,4,6-tricloroanisol a unos 20 ng/L no es un análisis muy difícil en la cerveza, porque la molécula es bastante apolar (fácilmente extractable, relativamente volátil) y tiene un espectro de masas con abundantes iones de altas relaciones m/z . Por el contrario, el análisis de furaneol a 1 $\mu\text{g/L}$ es bastante difícil porque se trata de un compuesto muy polar (difícil de extraer, no muy volátil) y su espectro de masas no tiene fragmentos especialmente notables. Para estos analitos de alta dificultad, algunos de los cuales son importantes aromas en la cerveza, se deben desarrollar estrategias específicas para su determinación:

- Aldehídos: El análisis directo de algunos carbonilos relevantes como E-2-nonenal, 2-metilpropanal o fenilacetaldehído, aunque puede llevarse a cabo, no es una técnica muy conveniente por su alta inestabilidad. Se han pro-

puesto diferentes alternativas, la mayor parte de ellas basadas en la formación de los derivados con pentafluorobenzil hidroxilamina (Figura 4) [24], pentafluorobenzil hidrazina [25], o 2,4 dinitrofenilhidrazina [26]. El empleo de los dos primeros reactivos es preferido para cromatografía gas, por permitir la determinación de los analitos utilizando la espectrometría de masas con Ionización Química Negativa (NCI) que proporciona mucha mayor sensibilidad. Una alternativa menos costosa es el empleo de detectores de captura electrónica (ECD). La derivatización se debe combinar con otra técnica de concentración como puede ser la SBSE [27], la SPME [24, 28-30] o la SPE [31].

- Compuestos azufrados muy volátiles (p.ej. dimetil sulfuro o etanotiol). Por su alta volatilidad este tipo de compuestos se determinan mejor analizando el espacio de cabeza y suele ser una buena elección emplear detectores específicos de azufre (PFPD, SCD, AED). Aunque los métodos propuestos en los años 80 y 90 se basaban fundamentalmente en la técnica de purga y trampa [32-36], en la actualidad la técnica que parece más adecuada es la SPME realizada sobre el espacio de cabeza [37-40].
- Mercaptanos polifuncionales. Los mercaptanos polifuncionales se encuentran entre los odorantes más potentes conocidos en la naturaleza, y deben ser cuantificados a niveles extremadamente bajos. Por ejemplo, se han reportado niveles umbrales para el MBT de hasta 1 ng/L [41]. Los métodos desarrollados para su determinación hacen uso de una separación selectiva mediante la formación de un aducto con p-hidroximercuribenzoato [42, 43]. La escasez de referencias de métodos de análisis en la literatura científica da fe, tanto de la dificultad de su análisis como de la poca importancia que el campo del aroma de la cerveza ha dado a estos compuestos.

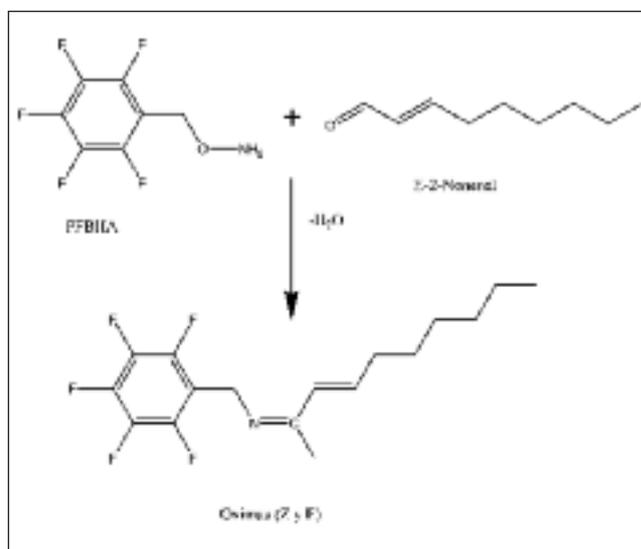


Figura 4. Reacción de derivatización de E-2-nonenal con pentafluorobenzil hidroxilamina.

5. Evaluando la importancia sensorial de los odorantes

La última etapa en la secuencia de elucidación del aroma es evaluar el papel que los compuestos identificados y cuantificados pueden desempeñar. La teoría clásica de la Química del Aroma establecía que los compuestos químicos influían en el aroma si su concentra-

ción estaba por encima del valor umbral de percepción en la matriz (esto es, si su OAV>1). A día de hoy, este razonamiento está superado porque se sabe de la existencia de diferentes efectos (aditivos, sinérgicos, antagónicos) y por la misma naturaleza multivariante del fenómeno de la percepción organoléptica. La estrategia, sin duda más rigurosa, que se debe seguir es la construcción de modelos basados en los datos cuantitativos obtenidos, y posteriormente someter estos modelos de mezclas de odorantes al juicio de paneles de análisis sensorial. Es lo que Hughes denomina *percepción holística del aroma* [41].

En lo que se refiere al aroma de la cerveza, son muy escasos los modelos propuestos para explicar cómo se produce la percepción de lo que se reconoce como el sabor/aroma de la cerveza. Sin duda, existen compuestos químicos individuales que explican defectos olfativos simples (p.ej. el MBT causante del *lightstruck*), pero apenas se conoce nada sobre como los odorantes interactúan entre sí y con la matriz. Por esta razón, son meritorios los trabajos realizados por Schieberle en la reconstitución completa de una cerveza [7] o Takoi modelando la contribución de los terpenoles del, lúpulo al aroma final [44].

6. Resumen y conclusiones

En este artículo se ha tratado de mostrar de forma sistemática como la Química del Aroma aborda el problema de elucidar el aroma de un producto, en este caso la cerveza. Al mismo tiempo se ha intentado mostrar las contribuciones científicas no de manera exhaustiva, sino las más interesantes según el criterio de los autores. A la vista de lo expuesto, no cabe duda que todavía queda mucho por hacer en este campo, pero también es cierto que el aroma de la cerveza, como objeto de estudio científico, sigue siendo ciertamente un desafío apasionante.

7. Bibliografía citada

- Nijssen, L., et al., *Volatile Compounds in Foods. Qualitative and Quantitative Data*. 1996, Zeist (The Netherlands): TNO Nutrition and Food Research Institute.
- Acree, T.E., J. Barnard, and D.G. Cunningham, *A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents*. *Food Chemistry*, 1984. **14**: p. 273-286.
- Meilgaard, M.C., *Flavor chemistry of beer : Part II : flavor and threshold of 239 aroma volatiles*. MBAA Technical quarterly, 1975. **12**(3): p. 151-167.
- Meilgaard, M., *Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1982. **30**: p. 1009-1017.
- Schieberle, P., *Primary odorants of pale lager beer*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1991. **193**(6): p. 558-565.
- Gijs, L., et al., *How low pH can intensify -damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(20): p. 5612-5616.
- Fritsch, H.T. and P. Schieberle, *Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(19): p. 7544-51.
- Guyot-Declerck, C., et al., *Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data*. *Food Quality and Preference*, 2005. **16**(2): p. 157-162.
- Vermeulen, C., et al., *Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers*. *J. Agric. Food Chem*, 2006. **54**(14): p. 5061-5068.
- Bravo, A., et al., *Formation of alpha-dicarbonyl compounds in beer during storage of Pilsner*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(11): p. 4134-44.
- Sanchez, N.B., et al., *Sensory and analytical evaluation of beers brewed with three varieties of hops and unhopped beer*. *Food Science Human Nutrition*, 1992. **29**: p. 403-406.
- Lermusieau, G., M. Bulens, and S. Collin, *Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(8): p. 3867-3874.
- Kishimoto, T., et al., *Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(12): p. 4701-4707.
- Eyres, G.T., P.J. Marriott, and J.P. Dufour, *Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(15): p. 6252-6261.
- Steinhaus, M., W. Wilhelm, and P. Schieberle, *Comparison of the most odouractive volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis*. *European Food Research and Technology*, 2007. **226**(1): p. 45-55.
- Zellner, B.d.A., et al., *Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review*. *Flavour and Fragrance Journal*, 2008. **23**(5): p. 297-314.
- Deans, R.R., *A new technique for heart cutting in gas chromatography*. *Chromatographia*, 1968. **1**: p. 18-22.
- Narziss, L., H. Miedaner, and S. Lustig, *The behaviour of volatile aromatic substances as beer ages*. *Mon.schr. Brauwiss.*, 1999. **52**(9-10): p. 164-175.
- Sakuma, S., H. Amano, and M. Ohkochi, *Identification of off-flavor compounds in beer*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2000. **58**(1): p. 26-29.
- Lusk, L.T., et al., *Beer Photooxidation Creates Two Compounds with Aromas Indistinguishable from 3-Methyl-2-butene-1-thiol*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2009. **67**(4): p. 189-192.

21. Sasamoto, K. and N. Ochiai, *Selectable one-dimensional or two-dimensional gas chromatography mass spectrometry with simultaneous olfactometry or element-specific detection*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(17): p. 2903-2910.
22. Marriott, P. and R. Shellie, *Principles and applications of comprehensive twodimensional gas chromatography*. Trends in analytical chemistry, 2002. **21**(9-10): p. 573-583.
23. Roberts, M., J. Dufour, and A. Lewis, *Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GCx GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil*. Journal of Separation Science, 2004. **27**(5-6): p. 473-478.
24. Saison, D., et al., *Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(26): p. 5061-5068.
25. Ojala, M., et al., *Analysis of aldehydes and ketones from beer as o-(2,3,4,5,6- pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives*. Talanta, 1994. **41**(8): p. 1297-1309.
26. Goncalves, L.M., et al., *Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: Characterization by high-performance liquid chromatography diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(24): p. 3717-3722.
27. Ochiai, N., et al., *Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **986**(1): p. 101-110.
28. Vesely, P., et al., *Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(24): p. 6941- 6944.
29. Jelen, H.H., et al., *Determination of C3-C10 aliphatic aldehydes using PFBHA derivatization and solid phase microextraction (SPME). Application to the analysis of beer*. Chem. Anal., 2004. **49**(6): p. 869-880.
30. Saison, D., et al., *Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1190**(1-2): p. 342-349.
31. Ferreira, V., et al., *Critical aspects of the determination of pentafluorobenzyl derivatives of aldehydes by gas chromatography with electron-capture or mass spectrometric detection - Validation of an optimized strategy for the determination of oxygen-related odor-active aldehydes in wine*. Journal of Chromatography A, 2006. **1122**(1-2): p. 255-265.
32. Narziss, L., H. Miedaner, and U. Kattein, *Determination of volatile sulfur compounds in wort and beer in the ppb-range*. Mon.schr. Brauwiss., 1983. **36**(1): p. 13-17.
33. Walker, M.D., *Estimation of volatile sulfur-compounds in beer*. Journal of the institute of brewing, 1992. **98**(4): p. 283-287.
34. Gerbersmann, C., R. Lobinski, and F.C. Adams, *Determination of volatile sulfur-compounds in water samples, beer and coffee with purge-and-trap gas chromatography microwave-induced plasma-atomic emission-spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 1995. **316**(1): p. 93-104.
35. Wampler, T.P., J.W. Washall, and M.J. Matheson, *Applications of purge-and-trap to the analysis of beers*. American Laboratory, 1996. **28**(11): p. T18-&.
36. Liu, J.M., et al., *Determination of volatile sulfur compounds in beverage and coffee samples by purge-and-trap on-line coupling with a gas chromatography flame photometric detector*. Microchimica Acta, 2004. **148**(1-2): p. 43-47.
37. Pinho, O., I. Ferreira, and L. Santos, *Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction*. Journal of Chromatography A, 2006. **1121**(2): p. 145-153.
38. Xiao, Q., et al., *Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection*. Journal of Chromatography A, 2006. **1125**(1): p. 133-137.
39. De Schutter, D.P., et al., *Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1179**(2): p. 75-80.
40. Campillo, N., et al., *Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(39): p. 6735-6740.
41. Hughes, P., *Beer Flavor. Beer a quality perspective*, 2010: p. 1-23.
42. Vermeulen, C., et al., *Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(14): p. 5061-5068.
43. Takoi, K., et al., *Identification and Characteristics of New Volatile Thiols Derived from the Hop (Humulus lupulus L.) Cultivar Nelson Sauvin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(6): p. 2493-2502.
44. Takoi, K., et al., *Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 5050-5058.