MEMORIA PROYECTO INTERNO
INTAEX 2008

“Estudio de los cambios en el perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos libres durante la maduración de la Torta del Casar”

INVESTIGADORES PARTICIPANTES:

ROSARIO RAMÍREZ BERNABÉ
JOSÉ GONZÁLEZ CRESPO
FRANCISCO JOSÉ DELGADO MARTÍNEZ

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO

AUTORES. Delgado F.J., González-Crespo J., Cava R., García-Parra J., Ramírez R.
TÍTULO: Characterization of the volatile profile of a Spanish ewe raw milk soft cheese PDO Torta del Casar during ripening by SPME-GC-MS
REF. REVISTA/LIBRO: Food Chemistry (submitted)

AUTORES. Delgado F.J., González-Crespo J., Luis Ladero L., Cava R., Ramírez R.
TÍTULO: Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO "Torta del Casar") during ripening
REF. REVISTA/LIBRO: International Journal of Food Science and Technology (submitted)

INTRODUCCIÓN.

El aroma del queso es uno de los factores más importantes de los consumidores a la hora de adquirir un producto. El perfil de compuestos volátiles refleja una imagen aproximada del olor y aroma de los quesos. El flavor típico cada variedad de queso es el resultado de un complejo balance entre compuestos químicos volátiles y no volátiles originados durante el proceso de maduración a partir de grasas, proteínas y carbohidratos de la leche (Fox & Wallace, 1997); y como consecuencia de esto, cada producto tiene un perfil único y característico de compuesto volátiles (Plutowska & Wardencki, 2007). Es bien conocido que la mayoría de los compuestos volátiles del aroma de un queso se forman principalmente durante la maduración. Las principales vías para la formación de compuestos del flavor en queso son la *glucolisis*, la *lipolisis* y la *proteolisis*. En la *glucolisis*, dependiendo de la variedad de queso, la microflora y las condiciones de maduración, el ácido láctico puede ser metabolizado por diferentes vías formando compuestos que contribuyen al flavor del queso. Los compuestos derivados de la grasa formados por *lipolisis* y reacciones de oxidación de lípidos, tales como ácidos grasos libres (AGL), ésteres, lactonas y cetonas, generalmente tienen bajos umbrales de percepción (Kinsella, 1975; Rothe et al., 1972; Siek et al., 1971). Los ácidos grasos libres son precursores de compuestos volátiles esenciales para el aroma (McSweeney & Sousa, 2000). Sin embargo, la *proteolisis* de las caseínas da lugar a péptidos de pequeño a mediano tamaño y a aminoácidos libres, que probablemente contribuyen en menor medida al aroma de la mayoría de variedades de queso.

La lipolisis es una reacción química que se desarrolla durante la maduración de los quesos. Los ácidos grasos libres (AGL) liberados durante la lipolisis, especialmente los de cadena media y corta (C4:0-C8:0 y C10:0-C14:0, respectivamente), contribuyen junto los compuestos volátiles formados y la proteólisis a la formación del flavor del queso (McSweeney & Sousa, 2000; Urbach, 1993). Los AGL de cadena larga (>14 átomos de carbono) se consideran menos importantes para la formación del aroma del queso, por sus elevados niveles umbral de percepción (Molimard & Spinnler, 1996). El grado de lipolisis depende mucho de la variedad de quesos, es por ello que algunos autores han sugerido la posibilidad de caracterizar los quesos según su estado de maduración teniendo en cuenta el perfil de AGL de cadena corta, media y larga (Woo, Kollodge & Lindsay, 1984). La importancia de los ácidos grasos libres como tal de debe a que estos no solo son compuestos aromáticos por sí mismos, sino que también actúan como precursores de una serie de reacciones catabólicas que participan en la formación de otros compuestos aromáticos como los metil cetonas, lactones, esteres, alcanos y alcoholes secundarios (McSweeney y cols., 2000).

La cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS), es un método utilizado en la identificación de compuestos volátiles responsables del aroma, pero es siempre necesario incluir un paso previo que involucra la extracción-preconcentración de la fracción volátil (Wilkes et al., 2000). Entre estas técnicas destaca la Microestracción de la Fase Sólida (SPME), desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990 (Kataoka et al., 2000). La técnica SPME requiere sólo una pequeña cantidad de muestra y permite aislar los analitos volátiles y semivolátiles a partir de matrices en estado sólido y líquido en poco tiempo, de una forma sencilla. Por esta razón, hoy en día la SPME es comúnmente usada para la extracción

de compuestos responsables de flavor en queso (Coda et al., 2006; Guillén et al., 2004; Hayaloglu & Brechany, 2007; Lecanu et al., 2002; Lee et al., 2003). Por otra parte la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización en llama permite identificar y cuantificar los ácidos grasos libres bien sean volátiles (de cadena más corta) o no volátiles (de cadena más larga) liberados durante la maduración en los quesos. Estos compuestos, de acuerdo con otros investigadores tienen gran importancia en la formación de compuestos aromáticos y sápidos que proporcionan un aroma típico y característico a cada tipo de queso.

El perfil de compuestos volátiles de algunos quesos españoles elaborados a partir de leche cruda de oveja, con Denominación de Origen Protegida (DOP), ha sido analizado en el queso Manchego (Fernández-García et al., 2002a, b; Villaseñor et al., 2000), La Serena (Carbonell et al., 2002 a, b), Roncal (Izco & Torre, 2000), Zamorano (Fernández-García et al., 2004b) e Idiazábal (Barron et al., 2007). Un gran rango de compuestos volátiles que contribuyen al flavor se identificaron en esos quesos. Los cambios en su perfil volátil y en su ratio pueden variar considerablemente lo que proporciona notas aromáticas diferentes y características que son asociadas con cada variedad de queso.

El queso blando con Denominación de Origen Protegida (DOP) "Torta del Casar" se produce en la región de Extremadura, al sureste de España. Es un queso bien conocido con un incremento en la producción cada año, ya que es muy apreciado por los consumidores por su alta calidad y flavor único. Este queso tiene una corteza semidura fina y ligera y una textura muy blanda que hace que la pasta pueda salir a través de las grietas de la corteza. Se utiliza leche cruda de oveja de las razas Merino o Entrefina (DOE 119/2001). No se utilizan cultivos iniciadores para la maduración de los quesos. La coagulación de la leche se produce mediante cuajo vegetal, previamente obtenido a partir de la maceración de las flores del cardo (*Cynara cardunculus* L.) en agua. Solamente los quesos de La Serena (España) y Serra da Estrela (Portugal) se elaboran también con cuajo vegetal. El uso de leche cruda de oveja y plantas coagulantes proporcionan a estos quesos un peculiar sabor ligeramente amargo y una textura untuosa. Por otro lado, la aceptabilidad del queso por los consumidores principalmente depende de sus cualidades sensoriales y, en este contexto, el flavor es determinante. Sin embargo, el perfil aromático de la Torta del Casar y los cambios durante la maduración no se ha estudiado aún a pesar de su importancia. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo es la caracterización del perfil aromático de la Torta del Casar a lo largo del proceso de maduración mediante la técnica SPME-GC/MS con objeto de conocer los compuestos más importantes que producen su aroma característico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras.

Las Tortas del Casar fueron producidas a partir de leche cruda de oveja Merina. No se añadieron cultivos inciadores o starters. Se utilizó cuajo vegetal obtenido a partir de las flores del cardo *Cynara cardunculus* L. para coagular leche. La leche se calentó a 28-32 ºC y la coagulación tuvo lugar después de 50-80 minutos. La cuajada fue cortada para incrementar el área superficial y el movimiento del suero fuera de la cuajada. Posteriormente la cuajada se depositó en moldes, donde fueron prensados durante 3-4 horas a una presión de 1-1.25 kg/cm^2. Los quesos se salaron con cloruro sódico. El periodo de maduración fue de 60-90 días. La legislación no permite el consumo de estos quesos antes de 60 días de maduración ya que están hechos con leche cruda. Según la regulación de la DOP, las propiedades físico-químicas deben ser: un mínimo de 50% de contenido de grasa en materia seca, un pH de 5.2-5.9 y un máximo del 3% de NaCl (DOE 119/2001).

PROYECTO FINAL

Tabla 1. Composición aproximada (pH, materia seca, grasa y contenido en proteína) de la Torta del Casar durante la maduración.

	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	ESM	P[z]
pH	6.69[a]	5.22[c]	5.37[bc]	5.46[b]	0.09	0.001
Materia seca (%)	51.95[b]	55.00[ab]	56.67[ab]	57.78[a]	0.69	0.013
Grasa (%) en MS	53.89	55.92	57.33	57.42	0.81	0.388
Proteína (%) en MS	30.66	29.68	29.74	30.91	0.50	0.770

a, b, c, d: las diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (Tukey's Test. *P*<0.05). ESM= Error Standard de la Media. MS= Materia Seca. [z]P: probabilidad.

Se adquirieron 4 quesos procedentes de 3 queserías diferentes de la DOP en cuatro estados de maduración, con 1, 30, 60 y 90 días. Por tanto, un total de 48 quesos fueron analizados, 12 de cada estado de maduración (Figura 1). De cada productor, cuatro quesos del mismo lote fueron recogidos a cada tiempo de maduración. Durante los primeros 60 días de maduración, los quesos fueron madurados en cada quesería. La composición de los quesos después de 60 días de maduración fue un 43.3% de humedad, 32.5% de grasa, 16.9% de proteína, un pH de 5.4 y un contenido en sal del 1.29%. Después de los 60 días de maduración, cuando los quesos pueden salir al mercado, éstos fueron retractilados con film transparente y colocados dentro de una caja de madera (un envase decorativo) para simular las condiciones de compra de los quesos. El último mes, los quesos envasados se mantuvieron en refrigeración a 5ºC. De cada queso, se tomaron muestras de pasta del queso que fueron almacenadas a -20ºC hasta que fueron analizados (menos de 2-3 semanas).

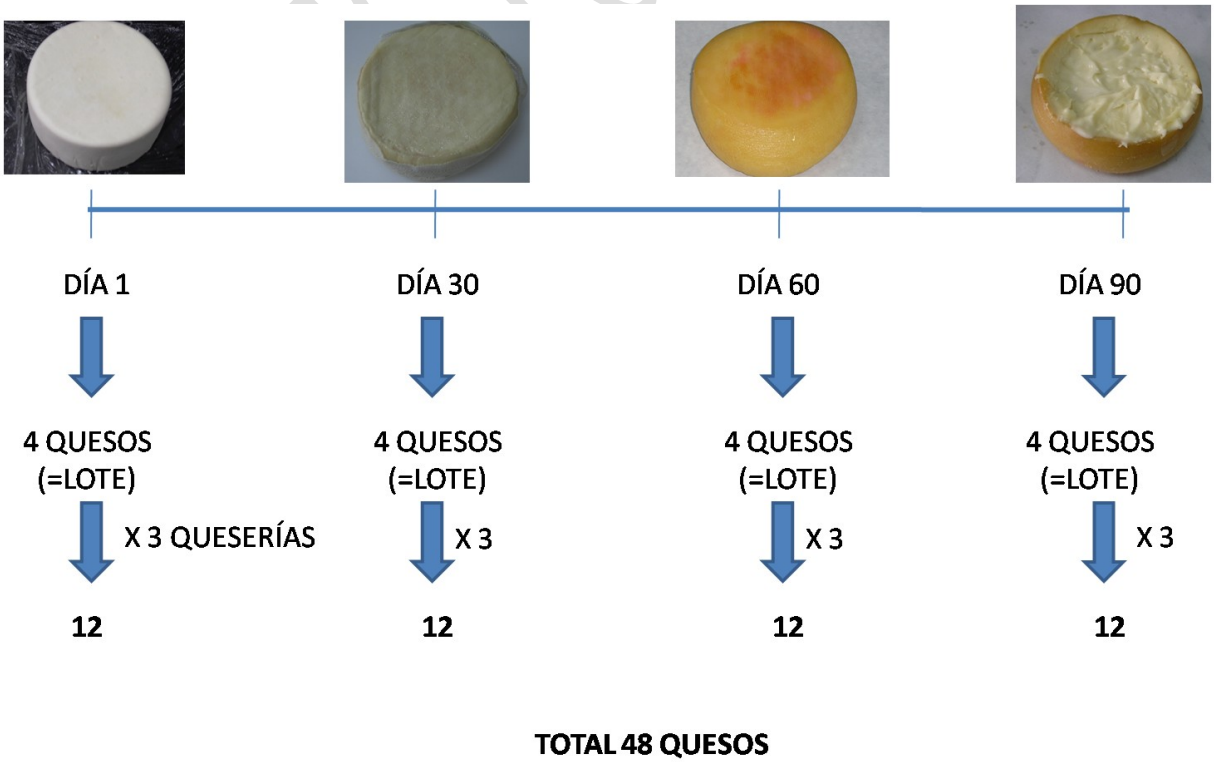


Figura 1. Diseño experimental del estudio de la Torta del Casar.

Análisis de compuestos volátiles (SPME-GC/MS.)

Para la extracción de compuestos volátiles se empleó el método de Lee et al. (2003). Diez gramos de queso fueron colocados en un vial de 50 mL y se añadió 10 mL de NaH_2PO_4. Se agitó durante 30 min a 50 ºC para acelerar el equilibrio de los compuestos volátiles entre el espacio de cabeza y la matriz del queso. Entonces, se llevó a cabo la extracción de los volátiles por inyección de una fibra de Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano en el vial y expuesto al espacio de cabeza durante otros 30 min a 50 ºC. Las muestras fueron directamente desorbidas en el puerto de inyección del GC a 250 ºC. Los análisis de los compuestos volátiles fueron realizados en un cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800 acoplado a un detector selectivo de masas VARIAN modelo Saturn 2200. Los compuestos volátiles se separaron utilizando una columna capilar HP Innowax de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.50 µm de grosor. El gas transportador fue He con un flujo de 1 mL/min. La temperatura del programa fue isoterma a 40ºC durante 10 min, entonces fue aumentada a 240ºC al rango de 5ºC min^{-1} y mantenida durante 11 min. La temperatura de la línea de transferencia del GC/MS fue de 280 ºC. El espectrómetro de masas operó en modo de impacto electrónico con una energía de impacto electrónico de 70 eV y un rango de recolección de datos de 0.7 scan seg^{-1} sobre un rango de masas de 40-650 m/z. n-Alcanos (Sigma R-8769) se analizaron bajo las mismas condiciones para calcular los valores de los índices de retención (IR) de los volátiles. Los compuestos fueron identificados por:
1.- Comparación con compuestos comerciales de referencia (Sigma),
2.- Comparación de los IR con aquellos descritos en la literatura,
3.- Comparación de sus espectros de masa con los contenidos en la librería NIST y Varian.

Análisis de ácidos grasos libres (AGL).
Los AGL se extrajeron siguiendo el método de De Jong and Bdings (1990) modificado. El queso (1g), molido con 3g de Na2SO4 anidro en una batidora analítica, se colocó en un tubo de tapadera de rosca y se añadieron 0.3mL de H2SO4 (2.5 M) y 50µl de una solución de standard interno (ácido nonanoico a una concentración de 8 mg/mL). A continuación se añadieron 3mL de dietil éter/heptano (1:1 v/v) y se agitó durante 3 min empleando un vortex. El sobrenadante fue transferido a un tubo de tapón de rosca que contenía 1g de Na2SO4 anidro. Esta operación fue repetida 3 veces. El extracto lipídico fue fraccionado utilizando una columna de aminopropilo (AccuBond^{II}SPE, Agilent Technologies, United Kingdom) que fue acondicionada con 10mL de heptano. Para eluir los triglicéridos se añadieron 10mL de cloroformo/2-propanol (2:1 v/v), mientras que los AGL se eluyeron con 5mL de dietil éter conteniendo el 2% de ácido fórmico. Se realizó una inyección directa de esta disolución (1µL) para los análisis de cromatografía de gases. Para cada muestra se realizaron dos extracciones. Los AGL extraídos se analizaron en un cromatógrafo de gases HP 6890 (Agilent Technologies, United States) equipado con un inyector HP 7683, una columna FFAP (Agilent Technologies, 30m x 0.25mm ID x 0.25µm) y un detector FID. Las muestras fueron analizadas antes de las 24 horas posteriores a la extracción debido a la volatilidad del solvente empleado. Se empleó un muestrador automático HP 7683 para la inyección de los AGL. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: una temperatura inicial de 50ºC mantenida 1 min, hasta una temperatura final de 240ºC a un rango de 5ºC/min mantenida 20 min. El flujo de He fue de 2mL/min y el split ratio 1:10. Para cada ácido graso se realizó una curva de regresión mediante el análisis del incremento de las cantidades de los ácidos grasos individuales (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) con cantidades fijas de estándar interno. Se calcularon ratios entre las diferentes fracciones que fueron empleados como variables para el análisis: ácidos grasos de cadena corta (AGCC, C4:0–C8:0), ácidos grasos de cadena media (AGCM, C10:0–C14:0), ácidos grasos de cadena larga (AGCL, C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2) y ácidos grasos insaturados (AGI, C18:1 y C18:2).

Análisis estadístico.

Las diferencias en el perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos libres durante la maduración fueron analizadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS, versión 14.0. También se aplicó el test de Tukey para comparar los valores medios de los compuestos volátiles de diferentes días de maduración. Se han calculado los valores medios y las desviaciones estándar. Las relaciones entre parámetros se

calcularon mediante el análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa Unscrambler 6.11.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

ESTUDIO 1: "Caracterización del perfil de compuestos aromáticos de la Torta del Casar durante la maduración mediante SPME-GC/MS".

Los compuestos volátiles (Unidades de Área -UA- x 10^5) aislados de la Torta del Casar mediante SPME-GC/MS durante 90 días de maduración se muestran en la tabla 2. Un total de 46 compuestos fueron detectados: 13 ácidos, 9 ésteres, 4 cetonas, 7 alcoholes, 3 aldehídos, 7 hidrocarburos aromáticos y 3 compuestos que no pueden ser clasificados en esos grupos. Se encontraron diferencias significativas en las variaciones de los compuestos volátiles durante la maduración. Los niveles de la mayoría de los compuestos detectados aumentaron durante la maduración formándose además nuevos compuestos, mientras que pocos compuestos disminuyeron a lo largo de la maduración. Comparado con el día 0, se encontró un importante incremento del total de unidades de área (UA) analizadas en los primeros 60 días de maduración, mientras que en los últimos 30 días, la cantidad de compuestos volátiles incrementó ligeramente (día 1: 230UA, día 30: 808UA, día 60: 1426UA, día 90: 1530 x 10^5 UA). Estos resultados muestran que a los 60 días de maduración cuando los quesos pueden ser comercializados, éstos han desarrollado la mayoría de compuestos volátiles que forman su perfil volátil característico.

PROYECTO INTERREG

Tabla 2. Compuestos volátiles (UA x 10^5) aislados a partir a partir de la “DOP Torta del Casar” a cuatro diferentes estados de maduración

RI[w]	Id. Método[x]	Compuestos	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	P[y]
		Acidos					
1460	RF, RI, TI	ácido acético	7.37c±3.00	171.34b±26.01	311.84a±101.59	339.05a±86.49	0.001
1553	RF, RI, TI	ácido propanoico	0.00b±0.00	4.43b±3.65	21.08a±19.59	25.67a±11.16	0.001
1581	RI, TI	ácido 2-metilpropanoico	0.00c±0.00	15.87bc±13.36	32.77ab±22.15	46.45a±27.69	0.001
1683	RF, TI	ácido butanoico	12.78±2.85	56.06±40.67	121.63±284.26	16.59±4.69	0.232
1678	RF, TI	ácido 3-metilbutanoico	1.40c±1.41	78.32b±63.42	297.08a±531.92	264.78a±106.34	0.029
1736	RI, TI	ácido pentanoico	0.40b±0.40	0.61b±0.58	1.57a±0.87	0.49b±1.14	0.003
1817	RF, TI	ácido hexanoico	35.95b±4.25	87.23a±45.89	36.94b±29.67	28.02b±38.59	0.001
-	TI	ácido (E)-3-hexenoico	30.88±99.06	0.00±0.00	23.14±18.85	35.36±30.51	0.372
1905	TI	ácido acético	6.18±14.49	1.22±0.51	1.27±.40	0.55±1.02	0.218
2064	RF, TI	ácido propanoico	34.52b±17.32	63.76a±11.58	62.84a±11.90	69.12a±15.87	0.001
-	TI	ácido 2-metilpropanoico	0.00b±0.00	27.40ab±19.13	40.05a±26.53	53.74a±62.59	0.004
2113	RF, TI	ácido butanoico	51.42b±7.27	56.83b±21.27	71.50a±9.93	57.15b±10.26	0.005
2486	RF, TI	ácido 3-metilbutanoico	16.20ab±13.93	10.57ab±13.23	22.23a±19.02	3.73b±4.05	0.013
Porcentaje (%)[z]			81.8	71.0	70.6	61.5	
		Esteres					
892	RF, RI, TI	ácido acético etil ester	0.00b±0.00	4.85a±2.53	4.04a±5.12	3.01a±1.16	0.001
1041	RF, RI, TI	ácido butírico etil ester	0.12c±0.23	3.42b±1.29	6.03ab±4.34	7.50a±4.72	0.001

PROYECTO INTERNO

1070	TI	ácido butanoico-3-metil,etilester	1.54ab±1.58	2.60a±1.38	1.50ab±0.77	1.23b±1.13	0.049
1121	TI	ácido acético-3-metil-1-butanol ester	0.00c±0.00	1.36b±0.87	1.19b±1.07	2.70a±1.51	0.001
1232	RF, RI, TI	ácido hexanoico etil ester	0.33b±0.50	13.64a±9.01	8.21a±4.12	12.82a±6.01	0.001
1292	TI	ácido 4-hexenoico etil ester	0.00c±0.00	0.08c±0.13	1.46b±1.36	4.35a±2.43	0.001
1438	RF, RI, TI	ácido octanoico etil ester	0.23c±0.44	11.05a±5.41	6.77b±3.18	10.84a±4.36	0.001
-	TI	ácido butanoico propil ester	1.48b±1.94	0.72b±0.41	173.28ab±242.23	229.83a±269.04	0.004
-	RF, TI	ácido dodecanoico etil ester	0.00b±0.00	0.85b±0.40	22.27b±32.36	57.32a±44.81	0.001
Porcentaje (%)			0	10.9	19.0	24.5	
		Cetonas					
818	RF, RI, TI	2-propanona	1.55a±0.59	0.51b±0.40	1.08ab±1.47	0.28b±0.36	0.002
906	RI, TI	2-butanona	0.29c±0.43	0.96c±0.83	41.70b±31.66	80.12a±52.11	0.001
1086	RF, RI, TI	2-heptanona	0.00b±0.00	0.00b±0.00	0.06b±0.22	24.63a±9.87	0.001
1309	RI, TI	3-hidroxi-2-butanona	0.17b±0.28	15.30a±21.04	4.34ab±1.71	6.06ab±1.53	0.009
Porcentaje (%)			0.9	2.1	3.3	7.3	
		Alcoholes					
940	TI	1-metoxi-2-propanol	2.02d±0.66	47.66a±12.78	33.32b±11.94	22.40c±7.89	0.001
1026	RF, RI, TI	2-butanol	0.26c±0.21	2.16c±1.74	12.50b±8.87	22.25a±15.67	0.001
1209	RF, RI, TI	3-metil-1-butanol	2.31c±1.65	49.39a±18.33	22.34b±13.13	0.00c±0.00	0.001
1219	RI, TI	2-metil-5-hexen-3-ol	0.16b±0.37	0.00b±0.00	0.00b±0.00	5.17a±4.43	0.001

PROYECTO INTERNO

1499	TI	2,5-dimetil-3-hexanol	1.30ab±1.62	1.62a±1.44	0.90ab±0.90	0.25b±0.59	0.049
1598	TI	2,4-hexadien-1-ol	0.00±0.00	0.44±0.39	0.47±0.38	2.93±7.43	0.220
-	TI	1-dodecanol	15.66±46.20	0.00±0.00	3.03±2.79	3.88±3.47	0.378
Porcentaje (%)			9.5	12.5	5.1	3.7	
		Hidrocarburos aromáticos					
1049	RI, TI	benzenoacetaldehido	1.16a±1.01	0.19b±0.20	0.27b±0.62	0.00b±0.00	0.001
1085	RI,TI	etildimetilbenzeno	0.00b±0.00	0.19b±0.31	0.00b±0.00	1.97a±1.03	0.001
1265	RI, TI	estireno	1.04±0.80	0.62±0.52	0.72±0.73	1.20±0.95	0.224
1531	RI, TI	benzaldehido	0.20b±0.37	0.44ab±0.21	0.36b±0.31	0.82a±0.62	0.005
-	RF, TI	benzilalcohol	2.13±0.89	7.97±12.21	4.90±5.65	9.63±4.79	0.065
1918	RF, RI, TI	feniletanol	0.00b±0.00	12.60a±3.58	12.44a±4.30	15.78a±5.14	0.001
-	TI	fenol	0.57b±1.43	2.30b±3.21	4.24ab±6.56	9.60a±10.32	0.007
Porcentaje (%)			2.2	3.0	1.6	2.5	
		Aldehídos					
923	RI, TI	3-metilbutanal	0.56ab±0.29	1.07a±1.13	0.00b±0.00	0.00b±0.00	0.001
1422	TI	2,4-hexadienal	0.49±0.38	0.26±0.25	0.10±0.18	0.33±0.64	0.131
-	RF, TI	dodecanal	0.00b±0.00	0.00b±0.00	1.51ab±2.16	2.72a±2.37	0.001
Porcentaje (%)			0.5	0.2	0.1	0.2	
		Otros					
-	RF, TI	3-metilpentano	0.97a± 0.78	0.03b±0.10	0.14b±0.47	0.00b±0.00	0.001

PROYECTO INTERNO

-	RF, TI	3-(metiltio)-1-propanol	1.71a±2.65	0.34ab±0.23	0.61ab±0.64	0.00b±0.00	0.023
2187	TI	δ-decalactona	0.00b±0.00	1.81ab±0.76	3.17ab±1.68	5.20a±7.18	0.011
Porcentaje (%)			2.2	3.0	1.6	2.5	

wRI: índice de retención, xMétodo de identificación: RF, espectro de masas y tiempo de retención idénticos a los compuestos de referencia; RI, espectro de masas e índice de retención a partir de la literatura concordantes; TI, identificación tentativa mediante el espectro de masas. a,b, c, d: Diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (Tukey's Test, $p<0.05$). yP: Probabilidad. zPorcentaje (%): porcentaje de cada grupo químico en cada día de maduración del queso.

PROYECTO INTERNO

La figura 2 muestra la evolución de los compuestos volátiles agrupados por su naturaleza química. El contenido de ácidos grasos libres (AGL) totales aumentó durante la maduración, especialmente en los primeros 60 días. Por lo tanto, (1) la lipolisis parece ser una importante vía de formación de AGL lineales con más de 4 átomos de carbono, (2) aunque los AGL más cortos pueden también originarse a partir de cetonas, ésteres y aldehídos mediante oxidación (Molimar & Spinnler, 1996), y (3) también mediante el metabolismo de lactosa, deaminación de aminoácidos y posiblemente oxidación de lípidos que pueden también contribuir al total de AGL. Los contenidos de ésteres detectados se incrementaron gradualmente a lo largo de la maduración. Las cetonas volátiles siguieron una tendencia similar a la descrita para los ésteres. Sin embargo, los niveles de alcoholes se incrementaron en el primer mes de maduración mientras que disminuyeron después del día 30. Esta disminución podría ser debida probablemente al incremento de ésteres, formados a partir de la esterificación de ácidos y alcoholes ya que el nivel de ácidos volátiles también tendió a disminuir al final de la maduración. Finalmente, el nivel de hidrocarburos aromáticos se incrementó al comienzo de la maduración pero su nivel se mantuvo constante.

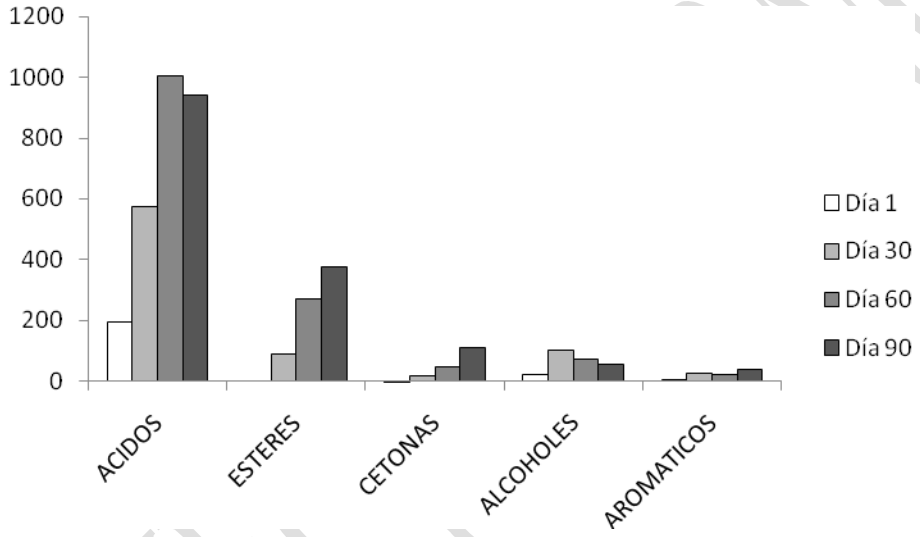


Figura 2. Cambios de los grupos químicos principales de los compuestos volátiles (UAx105) aislados en el queso blando Torta del Casar durante la maduración

Ácidos grasos libres (AGL). La figura 3 muestra la evolución de los AGL según su origen más probable de acuerdo con la literatura. Durante la maduración de los quesos, los AGL se pueden originar a partir de 3 vías bioquímicas principales: lipolisis, proteolisis y fermentación de lactosa (Curioni & Bosset, 2002). Las enzimas con actividad lipolítica (esterasas, lipasas) pueden causar la liberación de ácidos grasos de cadena lineal (butanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico), mientras que las enzimas proteolíticas son responsables de la formación de ácidos grasos de cadena ramificada (2-metilpropanoico, 3-metilbutanoico) mediante la deaminación de aminoácidos tales como valina, leucina e isoleucina (Berdagué et al., 1987; Kuzdzal-Savoie, 1980, Curioni & Bosset, 2002). En este caso, como los quesos son elaborados a partir de leche cruda, la lipolisis podría deberse a la acción de lipasas propias de la leche, debido a que no se añadieron cultivos iniciadores para la elaboración de los quesos. Además, según Stadhouders y Veringa (1973) y Urbach (1995), la lipasas responsables de la producción de AGL tienen su origen más probable a partir de la leche cruda que de las bacterias ácido lácticas. En este sentido, muchos tipos de quesos italianos elaborados a partir de leche cruda (ej. Parmigiano-Reggiano, Grana Padano, Provolone) presentan altos niveles de lipolisis debido a la acción de las lipoproteínas lipasas de la leche (Collins, McSweeney & Wilkinson, 2003).

Finalmente, el ácidos acético y propiónico podrían tener un origen microbiano como resultado de la fermentación de la lactosa debido a que los cambios en estos ácidos han sido previamente asociados al crecimiento de bacterias ácidos lácticas y propiónicas (Ziino et al.,

2005), respectivamente. El origen de los ácidos (E)-3-hexenoico y (E;E)-2,4-hexadienoico no está claro en la literatura, por lo que no han sido incluidos en la figura.

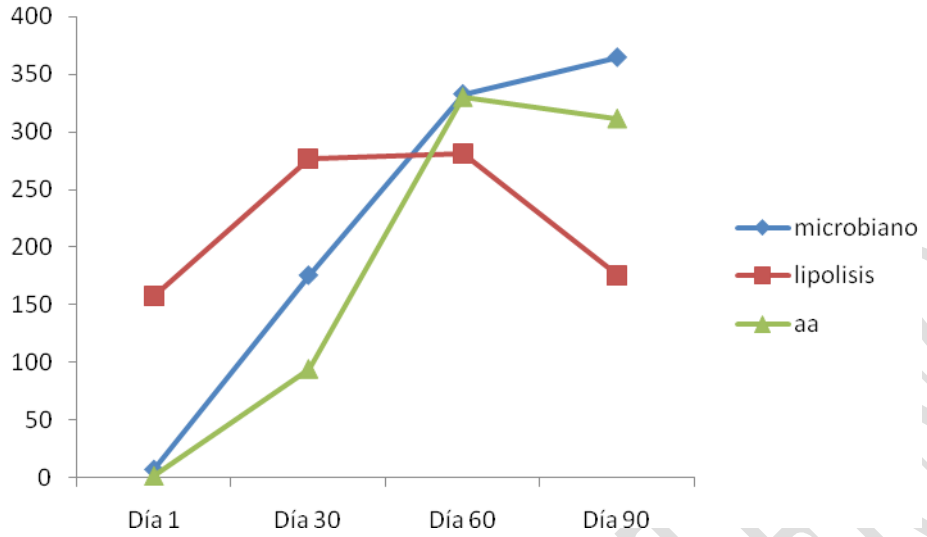


Figura 3. Evolución de los ácidos grasos libres (AGL) a lo largo de la maduración según su origen más probable. AGL con un origen microbiano (ácido acético y propiónico). AGL con origen en lipolisis (butanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico). AGL con origen en aminoácidos (2-metilpropanoico, 3-metilbutanoico)

A día 0, la mayoría de AGL detectados provienen de la lipolisis, mientras que los AGL no tienen su origen en los aminoácidos o la degradación microbiana. La cantidad de AGL con origen en la lipolisis aumentó en el primer mes de maduración, fue constante hasta el día 60 y entonces disminuyó. Los AGL procedentes de los aminoácidos aumentaron significativamente en los primeros 60 días de maduración y posteriormente disminuyeron ligeramente hasta el día 90. Los AGL con un origen microbiano aumentaron de forma importante durante la maduración, así que a día 90, los AGL con origen microbiano fueron los más abundantes, seguidos por los AGL con origen en los aminoácidos mientras que los AGL producidos a partir de la lipolisis de triglicéridos fueron los menos abundantes al final de la maduración. La elevada cantidad de AGL derivados de los aminoácidos podría estar relacionada con la elevada proteolisis de esos quesos a lo largo de la maduración como resultado de la adición de un coagulante vegetal (Carbonell et al., 2002a; Fernández-Salguero & Sanjuan 1999).

Los compuestos volátiles más abundantes en el espacio de cabeza de la Torta del Casar en todos los días de maduración fueron los AGL (Tabla 3) con un porcentaje comprendido entre el 61.5-81.8% del total. Los AGL además de proporcionar aroma por sí mismos son también son precursores de otros compuestos como metilcetonas, alcoholes, lactonas, aldehídos y ésteres (revisado por Collins et al., 2003). Debido a sus bajos umbrales aromáticos, los AGL de cadena corta y media contribuyen de forma importante al flavor en una gran variedad de quesos (Brennand & Lindsay, 1989; Kraggerud et al., 2008; Moio & Addeo, 1998; Pinho et al., 2003; Tavaria et al., 2004; Woo & Lindsay, 1982; Zerfiridis et al., 1984).

Al comienzo de la maduración, los AGL más abundantes fueron los ácidos hexanoico, (E)-3-hexenoico, octanoico y decanoico. Sin embargo, a día 90, se aislaron altas cantidades de ácido acético y ácido 3-metilbutanoico. El contenido de ácido acético incrementó de forma importante después de los 90 días de maduración y fue el mayor compuesto aislado en el espacio de cabeza del queso blando Torta del Casar. En general, los contenidos de ácido acético, ácido propanoico, ácido 2-metilpropanoico, ácido 3-metilbutanoico, ácido octanoico y ácido 2,4-hexadienoico incrementaron significativamente (P<0.05) al final de la maduración. Sin embargo, los contenidos de los ácidos butanoico, pentanoico, decanoico y dodecanoico tendieron a disminuir después de 30 ó 60 días de maduración, probablemente debido a su

transformación en otros compuestos químicos, como ésteres. Altas cantidades de ácido acético y propanoico se aportan "olor a vinagre", que puede ser relacionado con el sabor ligeramente ácido de algunos de estos quesos. El ácido acético es también el mayor odorante de otros quesos tales como Cheddar, Gruyère, Roncal y Emmental (Curioni & Bosset, 2002). El ácido acético se origina a partir de diferentes reacciones como la oxidación de lactosa por bacterias ácido lácticas en condiciones de anaerobiosis y a partir del catabolismo (deaminación oxidativa y descarboxilación) de la alanina y serina mediante de bacterias ácido lácticas (Ur-Rehman et al., 2000). El otro AGL mayoritario detectado, ácido 3-metilbutanoico, tiene su origen en la rotura de proteínas, concretamente en el aminoácido leucina (Kuzdzal-Savoie, 1980) y proporciona un "olor a rancio, a queso y a sudor" (Yvon & Rijnen, 2001). Algunos autores (Yvon & Rijnen, 2001) han atribuido el origen de estos compuestos a la acción de mohos, que no es muy probable en la Torta del Casar, teniendo en cuenta estudios microbiológicos realizados en la Torta del Casar (Cáceres et al., 1997; Poullet et al., 1991; Poullet et al., 1993). Sin embargo, esos compuestos pueden también originarse mediante oxidación a partir de su respectivo aldehído (3-metilbutanal podría proceder de la degradación del aminoácido isoleucina, y mediante oxidación, podría formarse el ácido 3-metilbutanoico); este origen último parece ser el más probable en la Torta del Casar. Por otra parte, el ácido propanoico tiene su origen en el metabolismo de lactosa mediante *Propionibacterium sp* (Steffen et al., 1987) mientras que el ácido 2-metilpropanoico es producido mediante el metabolismo del aminoácido valina (Molimard & Spinnler, 1996; Urbach, 1997). Los ácidos propanoico y 2-metilpropanoico contribuyen con notas de "olor acre" al aroma del queso (Avsar et al., 2004).

La importancia de los AGL de corta y media cadena ha sido investigada en otros quesos. Los ácidos hexanoico y butanoico fueron los AGL mayoritarios aislados en los quesos Provola dei Nebrodi (Ziino et al., 2005), Parmigiano (Bellesia et al., 2003) y en La Serena (Carbonell et al., 2002a); mientras que en los quesos Gruyère (Rychlik & Bosset, 2001) y Parmigiano los ácidos butanoico y propanoico fueron los AGL mayoritarios detectados y en quesos Cheddar, los ácidos decanoico, octanoico y hexanoico (Ur.-Rehman et al., 2000). El ácido hexanoico es también un componente del flovor característico de los quesos Padano y Roncal (Curioni & Bosset, 2002), sin embargo, el ácido mayoritario aislado en los quesos Zamorano (Fernández-García et al., 2004b) e Idizabal (Barron et al., 2007) fue el ácido butanoico. Por otro lado, el ácido octanoico fue otro ácido abundante aislado en éste queso, que añade "olores a sudor, graso, rancio y acre" en diferentes tipos de quesos (Curioni & Bosset, 2002), así que podría añadir unas notas de olor agradables al aroma de la Torta del Casar. Aunque el origen del ácido (E)-3-hexenoico es desconocido, su nivel sigue una tendencia opuesta al ácido hexanoico que tiende a disminuir después de los 30 días de maduración cuando el nivel del primero tiende a aumentar; así que consideramos que hay, probablemente, una relación entre ambos compuestos.

El perfil volátil de los quesos de La Serena (Carbonell et al., 2002 a, b), que tienen características similares a la Torta del Casar (elaborados a partir del leche cruda de oveja, empleo de coagulante vegetal), mostraron diferencias importantes ya que en ellos se detectaron más alcoholes y menos AGL. Estas importantes diferencias podrían ser explicadas por los diferentes métodos de extracción de compuestos volátiles empleados, ya que ellos utilizaron "purga y trampa" y nosotros SPME. Mallia et al. (2005) compararon ambos métodos y encontraron que las fibras de SPME fueron más efectivas para la extracción de compuestos con puntos de ebullición medios y altos, especialmente compuestos ácidos, mientras que la "purga y trampa" era más efectiva para la extracción de compuestos muy volátiles y alcoholes. Sin embargo, estas diferencias podrían ser también una evidencia del diferente perfil volátil de ambos quesos.

Ésteres. Los ésteres fueron los segundos compuestos más abundantes aislados en el espacio de cabeza de la Torta del Casar. Se forman a partir de la esterificación de ácidos grasos de corta y media cadena y alcoholes. Los organismos implicados en la formación de ésteres son principalmente levaduras (Molimard & Spinnler, 1996), sin embargo algunas bacterias del ácido láctico y *Micrococcaceae*, así como reacciones químicas, también pueden ser responsables (Gripon et al., 1991). La acción de las dos últimas parece ser más probable en la Torta del Casar (Cáceres et al., 1997; Poullet el al., 1991; Poullet et al., 1993).

Debido al origen microbiano de los ésteres, sus niveles fueron bajos al comienzo de la maduración e se incrementaron al final, especialmente el ácido butanoico propil éster (propil butirato/butanoato), que ha sido también encontrado en otros quesos como el Cheddar (Urbach, 1993), Fontina (Berard et al., 2007; Lawlor et al., 2001), Pecorino (Coda et al., 2006) y en quesos españoles con DOP elaborados a partir de leche cruda de oveja: Idiazabal, Manchego, Roncal, Zamorano y La Serena (Barron et al., 2005; Barron et al., 2007; Carbonell et al., 2002a, b; Fernández-García et al., 2004b; Gómez-Ruiz, 2002). Este compuesto proporciona notas de "aroma afrutado" al queso Ragusano (Curioni & Bosset, 2002).

Entre los ésteres, se detectaron 5 compuestos etil éster, 1 propil éster y 2 metil éster que fueron los químicamente más complejos (ácido butanoico 3-metil etil éster, ácido acético 3-metil 1-butanol éster). Como consecuencia, los etilésteres, debido a sus altas cantidades, probablemente podrían contribuir de manera importante al flavor global del queso Torta del Casar debido a que tienen bajos umbrales de percepción y porporcionan notas afrutadas a los quesos. Algunos de los compuestos más odorantes detectados en queso son etilésteres como el ácido butanoico etil éster (Cheddar, Emmental, crema Gorgonzola, Grana Padano, Pecorino, Ragusano) ácido hexanoico etil éster (Cheddar, natural Gorgonzola, Grana Padano, Pecorino, Ragusano), y el ácido octanoico etil éster (Flor de Guia) (Curioni & Bosset, 2002). Según de Frutos et al. (1991), las notas afrutadas proporcionadas por los etil ésteres pueden minimizar la fuerte rancidez derivada de los AGL ya que concentraciones excesivas de AGL pueden causar un aroma rancio. De forma similar, Carbonell et al. (2002a) consideró a los ésteres constituyentes claves del aroma de los quesos de La Serena. Los ésteres fueron los compuestos volátiles principales de otros quesos hechos a partir de leche cruda como: Canestrato Pugliese, Pecorino Romano, Manchego, Roncal, Castellano, Zamorano (Barron et al. 2005; Barron et al., 2007; Di Cagno et al., 2003; Fernández-García et al., 2004a, b; Izco & Torre, 2000; Larrayoz et al., 2001; Martinez-Castro et al., 1991; Villaseñor et al., 2000).

El incremento de algunos ésteres, como el ácido butírico etil éster y el ácido butanoico propil éster, probablemente originado por la esterificación del ácido butanoico y un alcohol, podría estar asociado con la disminución de ácido butanoico al final de la maduración, aunque las diferencias no fueron significativas. Además, la reducción de algunos alcoholes al final de la maduración podría también estar relacionada con el incremento de algunos ésteres tales como el 3-metil-1-butanol éster y el ácido acético 3-metil-1-butanol éster. Estos ésteres no han sido aislados anteriormente en otros quesos, así que podrían proporcionar notas aromáticas únicas y características a la Torta del Casar. Sin embargo, el ácido hexanoico etil éster, que tiene un marcado "olor a manzana inmadura", y el ácido butanoico etil éster mostraron un gran incremento durante la maduración; este comportamiento ha sido descrito también en otros quesos de leche de oveja (Barron et al., 2007; Carbonell et al., 2002a; Di Cagno et al., 2003; Mariaca et al., 2001).

Cetonas. Las cetonas son importantes componentes del perfil aromático de la mayoría de productos lácteos, aunque en este caso constituyeron solamente el 7.3% del total de compuestos aislados a día 90. Tienen olores típicos y bajos umbrales de percepción, así que su contribución al aroma global de los quesos es significativa.

La 2-butanona y 2-heptanona fueron las cetonas más abundantes detectadas durante la maduración. Apenas se aislaron en el día 1, pero mostraron un marcado incremento tras 90 días de maduración, por lo que podrían jugar un papel importante en el aroma final de la Torta del Casar. Este hecho también ha sido descrito en otros quesos con características similares; así, 2-butanona y 2-heptanona fueron abundantemente aisladas en los quesos Zamorano (Fernández-García et al., 2004b) y Manchego (Fernández-García et al., 2002a). Además, la 2-butanona fue una de las cetonas más abundantes en los quesos La Serena (Carbonell et al., 2002a, b) y Castellano (Fernández-García et al., 2004a). Por el contrario, la 2-propanona disminuyó durante la maduración; sin embargo, la 3-hidroxi-2-butanona o acetoina incrementó al comienzo de la maduración pero después su nivel disminuyó ligeramente, por lo que posiblemente este compuesto se transformó en otros y podría actuar como un compuesto intermediario. La 2-propanona, 2-butanona y 2-heptanona son metil cetonas o 2-cetonas. Son producidas por la β-oxidación de ácidos grasos libres, una vía involucrada en la liberación de ácidos grasos por lipolisis, su oxidación a β-cetoácidos y descarboxilación a metil cetonas con la pérdida de un átomo de C (McSweeney & Sousa, 2000).

Alcoholes. Los alcoholes fueron muy abundantes al comienzo de la maduración con un porcentaje entre el 10-12% del total de volátiles detectados en el primer mes de maduración (día 30), mientras que su nivel disminuyó hasta el 3.7% al final de la misma. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros quesos españoles de leche cruda de oveja, ya que los alcoholes fueron cuantitativamente el principal grupo químico encontrado en el espacio de cabeza de los quesos Zamorano (Fernández-García et al., 2004b), Manchego (Fernández-García et al., 2002a), La Serena (Carbonell et al., 2002a) y Castellano (Fernández-García et al., 2004a). Como se explicado anteriormente, es probable que la utilización de un método de extracción de compuestos volátiles diferente haya causado estas diferencias (Mallia et al., 2005).

Los niveles de 1-dodecanol y 2,4-hexadienol no cambiaron a lo largo de la maduración; los niveles de 2-butanol y 2-metil-5-hexen-3-ol aumentaron al final de la maduración, y los niveles de 1-metoxi-2-propanol y 2,5-dimetil-1-hexanol alcanzaron su máximo a día 30 y después tendieron a disminuir. Esos patrones diferentes en los cambios de los alcoholes volátiles durante la maduración podrían deberse a las diferentes vías metabólicas involucradas en la formación de alcoholes encontradas en queso: metabolismo de lactosa, reducción de metil cetonas, metabolismo de aminoácidos y degradación de los ácidos linoleico y linolénico (Molimard & Spinnler, 1996).

La mayoría de los alcoholes detectados en la Torta del Casar han sido también hallados en el espacio de cabeza de otros quesos con leche cruda de oveja (Fernández-García et al., 1996, Mariaca et al., 2001; Fernández-García et al., 2004b).

Hidrocarburos aromáticos. Los compuestos fenólicos contribuyen positivamente al flavor, pero cuando están a altas concentraciones proporcionan notas desagradables al queso. La mayoría de hidrocarburos aromáticos tienden a incrementar a lo largo de la maduración excepto el bencenoacetaldehído que no fue detectado en la Torta del Casar después de los 90 días de maduración. Así que, los niveles de etildimetilbenceno, benzaldehído y fenol fueron significativamente las mayores a día 90, mientras que los niveles de feniletanol fueron mayores después de 30 días de maduración y se mantuvieron constantes hasta el día 90. Sin embargo, las cantidades de estireno (vinilbenceno) y benzilalcohol no cambiaron durante la maduración y sus niveles fueron constantes. El estireno ha sido previamente encontrado en otros quesos tales como Provola di Nebrodi (Ziino et al., 2005) y Camembert (Molimard & Spinnler, 1996), al igual que el benzaldehído, feniletanol y fenol en el queso Mina Correa Lelles Nogueira et al., 2005).

Algunos de los hidrocarburos aromáticos detectados proceden de la reacción de Strecker. El fenilacetaldehído deriva de la fenilalanina mediante la reacción de Strecker (Sieber et al., 1995). Por otro lado, la degradación de Strecker de la fenilalanina es también responsable de la producción de feniletanol, probablemente por el metabolismo de levaduras (Correa Lelles Nogueira et al., 2005). Se cree que la α-oxidación de fenilacetaldehído produce benzaldehído, que añade notas aromáticas a almendra amarga al queso (Molimard & Spinnler, 1996). Ambos compuestos mostraron cambios opuestos durante la maduración lo cual corrobora en cierto modo esta hipótesis.

Aldehídos. Los aldehídos no son compuestos mayoritarios en queso, debido a que son rápidamente convertidos a alcoholes o a su correspondiente ácido (Dunn & Lindsay, 1985; Lemieux & Simard, 1992), así que sus niveles a lo largo de la maduración estuvieron entre el 0.1-0.5% del total de compuestos volátiles aislados. El bajo nivel de aldehídos sería indicativo de que el queso ha alcanzado una maduración óptima, debido a que concentraciones elevadas de aldehídos pueden causar aromas desagradables (Moio & Addeo, 1998).

Los tres aldehídos que fueron aislados mostraron un comportamiento diferente: el 3-metilbutanal fue detectado al inicio de la maduración pero no a los 60 y 90 días, el 2,4-hexadienal no cambió a lo largo de la maduración, y el dodecanal, que se detectó solamente después de 60 días de maduración y alcanzó su mayor nivel en el día 90. El primero es un aldehído Strecker, mientras que los otros dos podrían formarse por la oxidación lipídica de su respectivo alcohol. Así, el origen del dodecanal podría ser debido a la oxidación del 1-

dodecanol, ya que ambos mostraron un patrón opuesto en cuanto a los cambios en la maduración, y lo mismo podría haber sucedido con el 2,4-hexadienal y el 2,4-hexadien-1-ol. El dodecanal es un compuesto odor-activo con "olor a vainilla" aislado en el queso Ragusano (Carpino et al., 2004).

Otros. Sólo un alcano ramificado, el 3-metilpentano, se aisló al principio de la maduración, pero su cantidad disminuyó a lo largo de la maduración y no se detectó a día 90. La contribución de los hidrocarburos alifáticos al aroma global de la Torta del Casar podría ser baja debido a que estos compuestos tienen elevados valores umbral.

Los compuestos sulfurosos son originados esencialmente a partir de la degradación de metionina como resultado de la rotura de una unión entre carbono y sulfuro mediante una metionina-dimetiolasa (Yvon & Rijnen, 2001). El 3-metiltio-1-propanol o metionol es un compuesto odor activo del queso Ragusano (Carpino et al., 2004). Sin embargo, este compuesto tiene una importancia limitada en el aroma final de la Torta del Casar ya que no fue detectado al final de la maduración.

Solamente una lactona fue detectada, la δ-decalactona, que no fue aislada a día 1 pero su nivel incrementó a lo largo de la maduración y las cantidades mayores se encontraron a día 90. La δ-decalactona es una de las lactonas más comúnmente detectadas en quesos. Las lactonas aportan notas afrutadas y a fermentados cremosos dulces (Dufosse et al., 1994), así que podrían contribuir añadiendo notas aromáticas agradables al aroma de la Torta del Casar. Su origen no está claro; son ésteres cíclicos en los que las funciones ácido y alcohol pertenecen a la misma molécula. Las δ-lactonas pueden formarse a partir de δ-hidroxiácidos seguidamente a su liberación a partir de triacilglicéridos mediante lipolisis, por lo que la concentración de lactonas normalmente está correlacionada con la extensión de la lipolisis (Collins et al., 2003). De acuerdo con esto, hemos encontrado una relación similar entre los AGL, que incrementan durante la maduración y la formación de lactonas.

Análisis de la multivarianza. Un análisis de componentes principales (ACP) fue llevado a cabo para explicar los cambios en los compuestos volátiles durante la maduración. El componente principal (PC) #1 y #2 explicaron 24% y el 12% de la variabilidad respectivamente. La figura 4 muestra el diagrama resultante de las diferentes variables (coeficientes de los vectores característicos) para los dos primeros componentes principales (PC#1 and PC#2). Aunque todos los volátiles fueron incluidos en el análisis, solamente los compuestos que explicaron en mayor medida la variación de los datos han sido identificados en la figura. En el eje positivo en el PC#1, lejos del origen y explicando una parte importante de la varianza se localizan compuestos volátiles más abundantes en quesos con 90 días de maduración tales como AGL (ácido acético, ácido 3-metilbutanoico, 3-metilpropanoico), ésteres (ácido acético 3-metil-1-butanol ester), cetonas (2-heptanona, 2-butanona) y otros (2-butanol, dodecanal), sin embargo, en el eje negativo del PC#1 están compuestos relacionados con el flavor del queso al comienzo de la maduración (3-metilpentano, ácido heptanoico, bencenoacetaldehído, 2-propanona). En lo que se refiere a PC#2, algunos compuestos volátiles se localizaron en el eje positivo del plano (3-metilbutanol, metoxipropanol, ácido hexanoico etil éster o etil hexanoato) mientras que otros se localizaron en la parte baja del plano en el eje negativo (ácido hexenoico, ácido butanoico porpil éster o propilbutanoato).

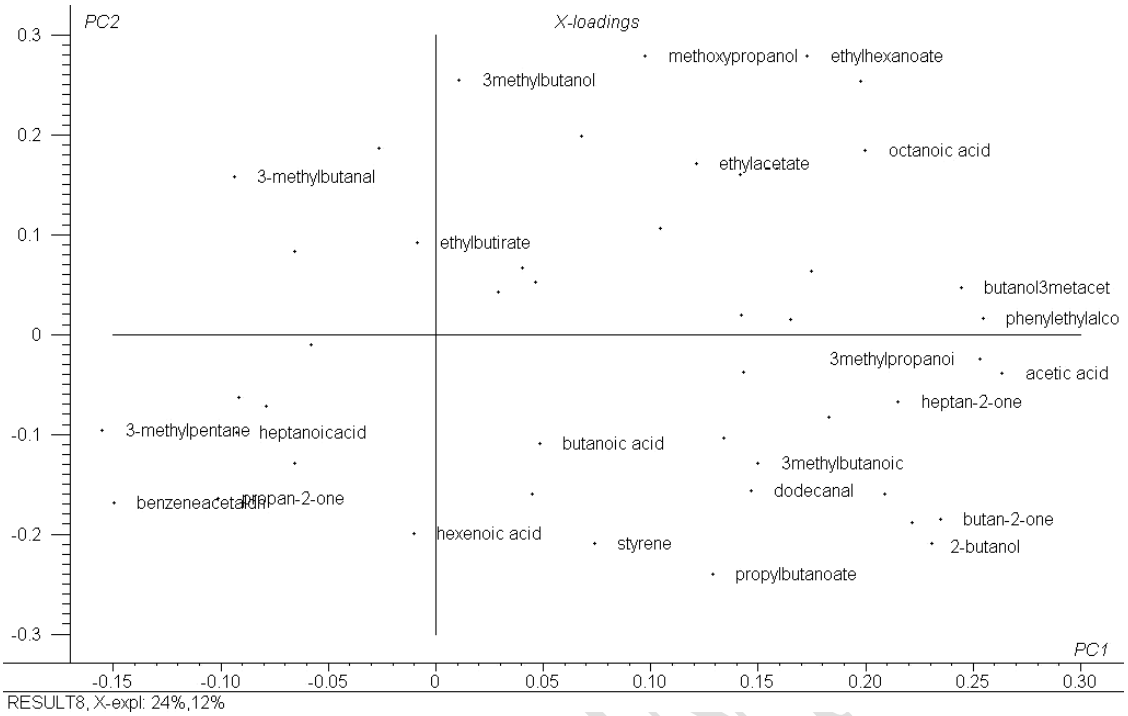


Figura 4. Diagrama generado después del análisis de componentes principales de las variables en el plano definido por los dos componentes principales (PC1 y PC2)

La distribución de los compuestos individuales en los dos primeros componentes principales (Figura 5) muestra 4 grupos de puntos separados, correspondientes a diferentes días de maduración. Los quesos del día 90 son localizados en el área positiva del PC#1 mientras que

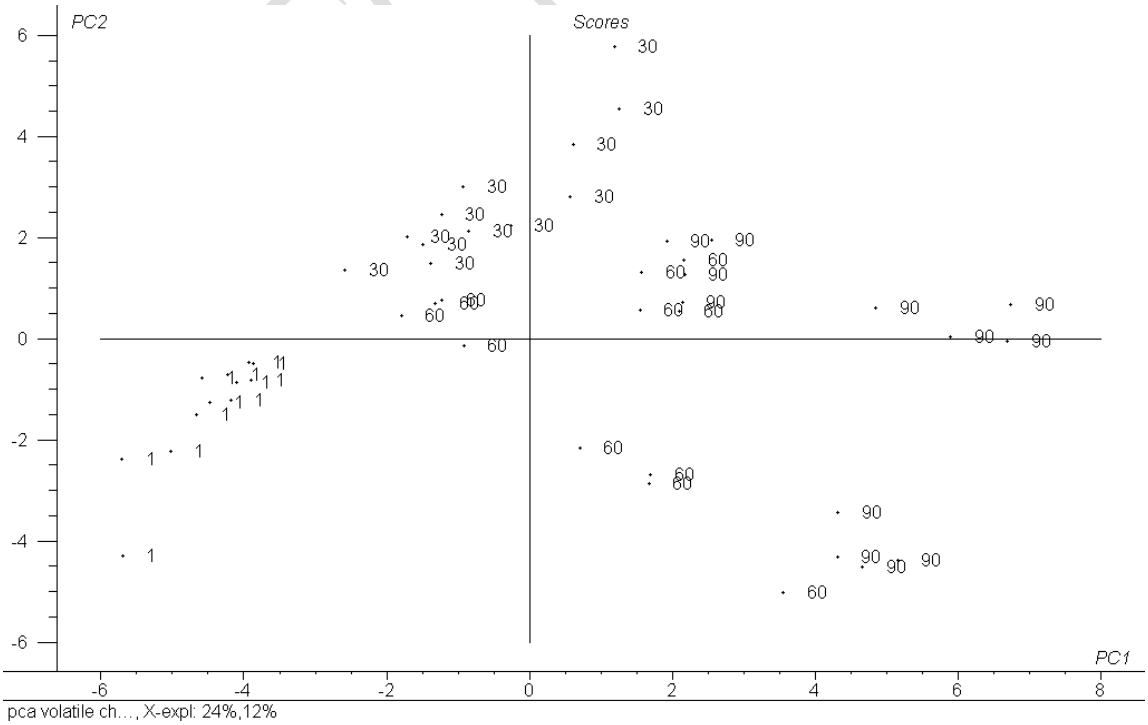


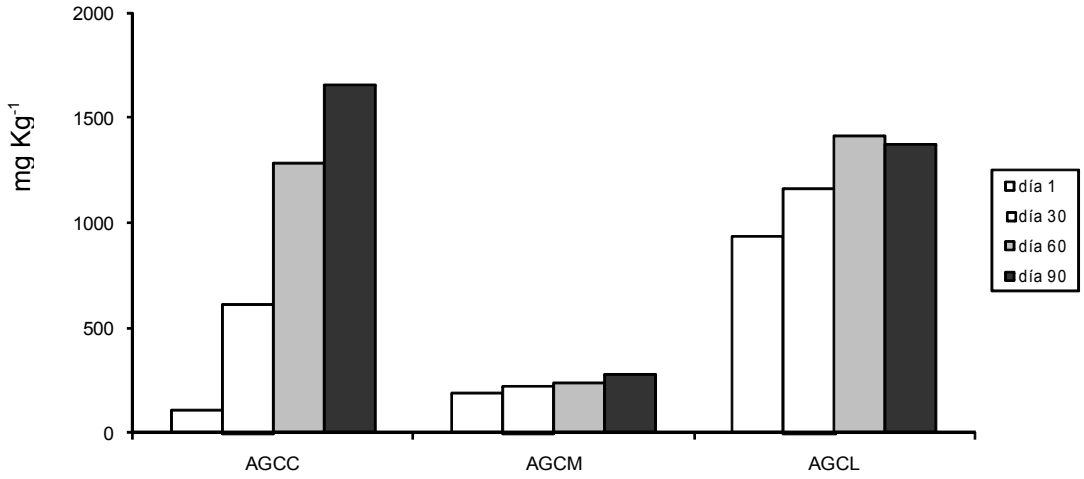
Figura 5. Diagrama resultante del análisis de los componentes principales de los compuestos individuales en el plano definido por los dos componentes principales (PC1 y PC2)

en el área negativa están aquellos que tienen 1 día de maduración. En el medio del plano se localizan los quesos con 30 y 60 días, así que aunque el PC#1 no puede explicar las diferencias entre esos grupos, sin embargo el PC#2 sí podría hacerlo ya que los quesos de un mes de maduración están en la parte superior y los de dos meses en la parta baja del plano. Los compuestos volátiles localizados en los extremos de los ejes del PC#2 son más característicos en el perfil de compuestos volátiles de quesos con 30 y 60 días de maduración.

ESTUDIO 2: "Cambios en la composición de ácidos grasos libres de la Torta del Casar durante su maduración".

La figura 6 muestra la evolución de los ácidos grasos libres de cadena corta (AGCC, C4:0–C8:0), ácidos grasos de cadena media (AGCM, C10:0–C14:0) y ácidos grasos de cadena larga (AGCL, C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2) durante la maduración del queso Torta del Casar. Las cantidades de AGCC, AGCM y AGCL aumentaron durante la maduración, alcanzando los valores más elevados al final de la maduración (día 60) y después de un mes de refrigeración (día 90). Los AGCC, que tienen un impacto significativo en el desarrollo del aroma característico del queso, tuvieron el mayor incremento. Se encontraron cantidades de AGCC significativamente mayores (P<0.001) después de 90 días de maduración. Estos resultados se deben a que las lipasas (procedentes de la leche y microorganismos) involucradas en la maduración del queso, liberan preferentemente AGCC (Collins y cols., 2003; Fuente, Fontecha & Juarez, 1993). Además, las lipasas permanecen activas en quesos de leche cruda debido a que su actividad se reduce por pasteurización (Collins y cols., 2003; McSweeney y cols., 2000). Por otro lado, los AGCM se mantuvieron bastante constantes durante la maduración aunque las cantidades de AGCM fueron significativamente mayores al final de la maduración comparado con tiempos de maduración más cortos. Los AGCL incrementaron significativamente hasta los 60 días de maduración, sin embargo, no se encontraron diferencias entre las cantidades de AGCL a día 60 y 90. Estudios previos en quesos con características similares a la Torta del Casar (leche cruda de oveja, cuajo vegetal) también han encontrado incrementos de AGL durante la maduración del queso, como son el queso de La Serena (Fernández-García y cols., 2006) y el queso Serra da Estrela (Macedo y cols.1996; Partidario y cols., 1998). En otros quesos de leche cruda de oveja tales como Idiazabal (Chávarri, Bustamante, Santisteban, Virto, Barron & de Renobales, 1999), Manchego y Zamorano (Fernández-García y cols., 2006) también se han encontrado incrementos en los AGL a lo largo de la maduración. Concretamente, el queso de La Serena, a pesar de tener un período de maduración más corto mostró una lipolisis más marcada en comparación con otros quesos de tiempos de maduración más largos como son el Manchego y el Zamorano (Fernández-García y cols., 2006). Chávarri y cols.(1999) encontraron incrementos de AGCC, mientras que los AGCM se mantuvieron constantes y AGCL disminuyeron en la maduración del queso Idiazabal lo que coincide con los cambios encontrados en el queso Torta del Casar. No obstante, Macedo y cols. (1996) encontraron un incremento similar para AGCC, AGCM y AGCL en el queso Serra da Estrela. Las diferencias pueden ser debidas a las razas de ovejas, al periodo de lactancia o la dieta de los rebaños, así como los diferentes tiempos de maduración de los quesos y el tipo de cuajo empleado.

Figura 6. Cambios en los ácidos grasos libres (mg Kg^{-1}) durante la maduración del queso Torta del Casar.



AGCC (ácidos grasos de cadena corta: C4:0–C8:0), AGCM (ácidos grasos de cadena media: C10:0–C14:0), AGCL (ácidos grasos de cadena larga: C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2). a, b, c, d: las diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (Test de Tukey. P<0.05).

La tabla 2 muestra las cantidades de ácidos grasos libres (AGL) individuales durante la maduración del queso Torta del Casar. Las cantidades de AGL totales fueron similares a las halladas por Fernández-García y cols.(2006) en la torta de la Serena pero más bajas que los valores encontrados por Macedo y cols.(1996) y Partidario y cols.(1998) en los quesos Serra da Estrela, probablemente debido al menor tiempo de maduración de los últimos (35 días). Los análisis de la varianza indicaron que el contenido de la mayoría de AGL se incrementó durante la maduración (P<0.05), excepto los ácidos valérico (C5:0) y margárico (C17:0), aunque sus cantidades tendieron a aumentar. Se ha encontrado que las cantidades de estos ácidos grasos en quesos de leche cruda son un poco bajas e incluso a menudo no son detectados (Chávarri y cols., 1999; Fernández-García y cols., 2006; Fuente y cols., 1993; Macedo y cols., 1996). El ácido valérico (C5:0), cuando está presente, imparte al queso unas notas de aromáticas percibidas como “olor a queso, a carne, a podrido” (Urbach, 1993). El incremento encontrado para la mayoría de AGL tras 90 días de maduración fue especialmente marcado para los ácidos isovalérico (C5:0) y linolénico (C18:3), que no fueron detectados a día 1 pero que mostraron niveles elevados al final de la maduración.

El contenido en ácido acético (C2:0) incrementó significativamente (P< 0.001) durante la maduración y fue el AGL más abundante en la Torta del Casar al final de la maduración (3901-6089 mg Kg^{-1}). El ácido acético no es un producto de la lipolisis, procede de otras reacciones bioquímicas a partir de la fermentación de lactato o el metabolismo de aminoácidos llevado a cabo por bacterias (Fox y cols., 1993). El elevado contenido de ácido acético detectado concuerda con el análisis del perfil volátil del queso Torta del Casar, donde el acético fue el principal ácido volátil aislado (Delgado y cols., en revisión). Los niveles de acético encontrados fueron mayores que en otros quesos de leche cruda de oveja como el de La Serena (Fernández-García y cols., 2006) y probablemente contribuye de forma notable al flavor final del queso Torta del Casar añadiéndole notas aromáticas “picantes y acres”.

A día 1 de maduración, el perfil de AGL de los quesos mostró niveles elevados de AGCL como los ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) (264.76 mg Kg^{-1}, 154.88 mg Kg^{-1} and 303.93 mg Kg^{-1}, respectivamente), sin embargo, se detectaron cantidades inferiores de AGCC y AGCM. Esto coincide con los resultados encontrados por Macedo y cols.(1996) para el queso Serra da Estrela. Las mayores cantidades de AGCL encontradas en la Torta del Casar a día 1 pueden deberse a que los ácidos palmítico y oleico son los predominantes en leche de oveja. Por el contrario, cuando los quesos se encontraron en

condiciones óptimas de consumo (60-90 días), los AGCC fueron los AGL mayoritarios y entre ellos los ácidos butírico (C4:0) e isovalérico (iC5:0) seguidos de los ácidos isobutírico (iC4:0) y valérico (C5:0). Además, el cálculo del índice de lipolisis (AGL liberados por día) mostró que los AGCC sufrieron mayor grado de lipolisis (17.26 mg Kg^{-1} day^{-1}) comparado con los AGCM (0.99 mg Kg^{-1} day^{-1}) y los AGCL (4.88 mg Kg^{-1} day^{-1}). Estos resultados coinciden con los encontrados por Chávarri y cols. (1999) en el queso Idiazabal, pero no coinciden con los de Macedo y cols.(1996) en el queso Serra da Estrela, donde los AGCL, AGCM y AGCC tuvieron un valor similar, probablemente debido a su corto período de maduración (35 días).

Tabla 3. Cambios en los ácidos grasos libres (mg Kg^{-1}) del queso Torta del Casar durante los 90 días de maduración.

Ácido graso	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	ESM	P[z]
Acético (C2:0)	410.80^{c}	2393.73^{b}	3900.78^{b}	6089.35^{a}	372.84	0.001
Isobutírico (iC4:0)	1.24^{c}	37.62^{bc}	78.92^{ab}	129.65^{a}	10.35	0.001
Butírico (C4:0)	47.07^{b}	118.07^{ab}	649.21^{ab}	837.41^{a}	110.05	0.019
Isovalérico (iC5:0)	0.00^{c}	388.30^{b}	462.08^{b}	550.24^{a}	32.47	0.001
Valérico (C5:0)	44.86	45.64	58.95	91.57	7.31	0.077
Caproico (C6:0)	8.56^{c}	15.88^{b}	16.50^{b}	26.01^{a}	1.27	0.001
Caprílico (C8:0)	4.30^{b}	10.88^{b}	14.92^{ab}	25.04^{a}	2.11	0.003
Cáprico (C10:0)	33.67^{c}	49.51^{b}	52.61^{ab}	66.73^{a}	2.56	0.001
Laurico (C12:0)	65.11^{b}	75.12^{ab}	75.19^{ab}	87.09^{a}	2.12	0.002
Mirístico (C14:0)	85.54^{c}	99.11^{bc}	107.97^{ab}	119.62^{a}	3.15	0.001
Pentadecanoico (C15:0)	22.31^{b}	24.32^{ab}	25.99^{a}	26.61^{a}	0.40	0.001
Palmítico (C16:0)	264.76^{b}	326.88^{ab}	405.42^{a}	376.65^{ab}	16.97	0.015
Palmitoleico (C16:1)	45.73^{b}	51.78^{a}	52.34^{a}	55.96^{a}	0.81	0.001
Margárico(C17:0)	56.51	73.99	61.99	75.18	2.93	0.058
Esteárico (C18:0)	87.56^{b}	115.36^{b}	282.72^{a}	140.90^{ab}	23.69	0.013
Oleico (C18:1)	154.88^{b}	248.71^{ab}	251.13^{ab}	330.01^{a}	16.42	0.001
Linoleico (C18:2)	303.93	314.87	330.29	330.19	3.93	0.040
Linolénico (C18:3)	0.00^{b}	11.07^{b}	8.44^{b}	39.77^{a}	3.77	0.001
Total AGL[1]	1226^{b}	2007^{b}	2935^{a}	3309^{a}	157	0.001

a, b, c, d: las diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (Test de Tukey. $P<0.05$). ESM= Error Standard de la Media. [z]P: probabilidad. [1]Ácido acético no incluido.

Los AGCC y AGCM juegan un papel importante en el flavor típico de los quesos debido a que poseen umbrales de percepción considerablemente más bajos y que proporciona notas aromáticas características a cada uno (Collins y cols., 2003). Los AGCC tienen mayor impacto en el flavor del queso que los AGCM (McSweeney y cols., 2000), debido a su mayor volatilidad. Entre los AGCC el ácido butírico, el AGL mayoritario en este estudio (a excepción del ácido acético), tiene un olor similar al queso rancio y tiene gran importancia en el flavor de quesos como el Camembert, Cheddar, Gruyère, Pecorino, Raguso y Roncal (reviewed by Curioni &

PROYECTO INTERNO

Bosset, 2002). Este ácido graso podría contribuir significativamente al perfil aromático de la Torta del Casar debido a que la cantidad alcanzada al final de la maduración (649.21-837.41 mg Kg^{-1}) fue mayor que las encontradas en otros tipos de quesos elaborados con leche de oveja cruda y con cuajo vegetal, como son los quesos de La Serena (Fernández-García y cols., 2006) y Serra da Estrela (Macedo y cols., 1996; Partidario y cols., 1998). Además, el ácido butírico fue uno de los compuestos ácidos volátiles aislados más abundantes en el espacio de cabeza de la Torta del Casar a los 60-90 días de maduración en el estudio realizado de forma paralela del perfil de compuestos volátiles (Delgado y cols., en revisión). El segundo AGL más abundante a los 60-90 días de maduración fue el ácido isovalérico (462.08-550.24 mg Kg^{-1}) que aporta aromas "a rancio, a queso, a sudoroso y a podrido", y probablemente contribuye al aroma a queso muy maduro (Yvon & Rijnen, 2001) característico de la Torta del Casar. Además, el ácido isobutírico, que proporciona un olor a agrio al queso Cheddar, aumentó de forma importante a lo largo de la maduración de la Torta del Casar (Avsar, Karagul-Yuceer, Drake, Singh, Yoon & Cadwallader, 2004). Los demás AGCC detectados en este queso, como son el ácido caproico (C6:0) y el caprílico (C8:0), pueden tener menor influencia en el aroma final ya que sus cantidades fueron más bajas a las obtenidas para los quesos de la Serra da Estrela (Macedo y cols.,1996), Idiazabal (Chávarri y cols., 1999), La Serena, el Manchego y el Zamorano (Fernández-García y cols., 2006). Por otro lado, las cantidades de AGCM fueron similares a las de los quesos de La Serena (Fernández-García y cols., 2006) y de la Serra da Estrela (Macedo y cols., 1996). El ácido mirístico fue el más abundante en cada estadío de maduración coincidiendo con lo publicado por Fuente y cols.(1993) para quesos de leche de oveja. Sin embargo, los ácidos cáprico (C10:0), laúrico (C12:0) y el propio mirístico (C14:0) alcanzaron cantidades intermedias. Éstos imparten al queso de leche de oveja cruda Roncal "olores a leche, a corteza y a sudado" (Curioni y cols., 2002).

Tabla 4. Valores medios de los índices de ácidos grasos libres (AGL) calculados durante los cambios en la maduración del queso Torta del Casar.

FFA index	Día 1	Día 30	Día 60	Día 90	ESM	P[z]
AGCC/total AGL	0.09[c]	0.30[b]	0.41[ab]	0.46[a]	0.03	0.001
AGCM/total AGL	0.15[a]	0.11[b]	0.09[b]	0.09[b]	0.01	0.001
AGCL/total AGL	0.76[a]	0.58[b]	0.50[bc]	0.45[c]	0.02	0.001
AGCC/AGCL	0.11[b]	0.53[ab]	1.16[a]	1.31[a]	0.13	0.001
AGCM/AGCL	0.20	0.19	0.19	0.20	0.00	0.661
AGCC/AGCM	0.58[b]	2.83[ab]	6.00[a]	6.61[a]	0.64	0.001
AGI/AGCL	0.54[ab]	0.54[ab]	0.49[b]	0.55[a]	0.01	0.033

a, b, c, d: las diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (Test de Tukey. $P<0.05$). ESM= Error Standard de la Media. [z]P: probabilidad. AGCC (ácidos grasos de cadena corta: C4:0–C8:0), AGCM (ácidos grasos de cadena media: C10:0–C14:0), AGCL (ácidos grasos de cadena larga: C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2) y AGI (ácidos grasos insaturados: C18:1 y C18:2)

Durante la maduración del queso, los AGL de 4 o más átomos de carbono pueden originarse a partir de la ruptura de aminoácidos o a partir de la lipolisis de la grasa por la acción de lipasas endógenas de la leche que permanecen activas en quesos de leche cruda (Urbach, 1993) como en la Torta del Casar. Los ácidos isobutírico e isovalérico se producen a partir del metabolismo de los aminoácidos valina y leucina, respectivamente (Molimard y cols., 1996). Sin embargo, una proporción menor de AGL se origina a partir de la degradación de lactosa (Curioni y cols., 2002). Aunque los lactococos poseen una baja actividad lipolítica, pueden hidrolizar la grasa de la leche de forma significativa durante la maduración del queso si están presentes a altos niveles y en ausencia de una flora superficial lipolítica (Fryer, Reiter & Laurence, 1967). De hecho, Poullet y cols.(1993) aislaron importantes cantidades de lactococos durante los primeros 15 días de maduración de la Torta del Casar. Además, los AGCC pueden

también formarse a partir de cetonas, ésteres y aldehídos mediante oxidación (Molimard y cols., 1996).

La tabla 4 muestra los valores medios de los ratios de AGCC, AGCM y AGCL con respecto al total de AGL y de los índices AGCC/AGCL, AGCM/AGCL, AGCC/AGCM y AGI/AGCL, observados durante la maduración de la Torta del Casar. Se encontraron diferencias muy significativas (P<0.001) en todos los índices dependiendo del estado de maduración del queso, excepto para AGCM/AGCL (P>0.05) y AGI/AGCL (P<0.05). El ratio AGCC/total AGL aumentó a lo largo de la maduración y alcanzó el valor más alto a los 90 días (AGCC/total AGL= 0.46). Sin embargo, los índices de AGCM y AGCL/total AGL disminuyeron durante la maduración e incluso se encontraron valores significativamente más bajos al final de la maduración. El incremento significativo de los AGCC fue reflejado también por el incremento de los índices AGCC/AGCL y AGCC/AGCM, mientras que el índice AGCM/AGCL mantuvo niveles constantes durante la maduración del queso. Fernández-García y cols.(2006) calcularon estos índices para los quesos Manchego, Zamorano y La Serena y encontraron índices mucho más bajos para AGCC/total AGL, AGCC/AGCL y AGCC/AGCM que los reflejados en el presente trabajo. Estos resultados podrían indicar que los AGCC tienen un importante papel en el aroma del queso Torta del Casar debido a sus elevados niveles y bajos umbrales de olor. Es destacable, que el índice AGI/AGCL fue muy similar al obtenido en los quesos de la Serra da Estrela (Macedo y cols., 1996) y La Serena (Fernández-García y cols., 2006). Fernández-García y cols. (2006) atribuyeron el alto contenido de ácidos grasos insaturados del queso La Serena al uso de leche de oveja Merina. Esta podría ser la razón de la uniformidad del índice AGI/AGCL en los quesos La Serena, Serra da Estrela y Torta del Casar, ya que todos son elaborados a partir de leche de la raza Merina.

PROYECTO INIA

CONCLUSIONES.

1.- El perfil aromático de la Torta del Casar muestra una gran complejidad por la gran variedad y abundancia de compuestos volátiles detectados al final de la maduración. Los elevados incrementos de ácidos grasos libres, ésteres y cetonas durante la maduración muestran que estos compuestos tienen una gran importancia en el perfil final de compuestos volátiles de la Torta del Casar.

2.- El perfil de compuestos volátiles de la Torta del Casar fue bastante diferente al encontrado en otros estudios en quesos con similares características a éste (La Serena, Serra da Strella). Es probable que la utilización de diferentes métodos de análisis entre estos estudios y el nuestro haya podido ser un factor importante en estas diferencias, más estudios son necesarios para concluir en este punto de forma adecuada.

3.- La gran proporción de ácidos grasos libres detectada sobre el total de compuestos volátiles indica que éstos podrían tener un papel muy importante en el aroma típico de la Torta del Casar por ser compuestos aromáticos por sí mismos y por ser compuestos clave para la formación de otros compuestos volátiles a partir de ellos.

4.- El estudio de ácidos grasos libres mediante cromatografía de gases y detector FID permitió cuantificar los cambios de los mismos durante la maduración de la Torta del Casar. Las cantidades de ácidos grasos libres aumentaron considerablemente durante la maduración pero especialmente los de cadena corta, los cuales por su alta volatilidad tienen una gran participación en el aroma característico de la Torta del Casar.

5.- La caracterización del perfil de compuestos volátiles es el primer paso para definir el tiempo óptimo de maduración y de aceptación por parte del consumidor. Aunque se necesitan más estudios para conocer la influencia relativa de cada compuesto en el aroma global característico de este queso; el hecho de que no haya un gran aumento en la abundancia relativa del total de compuestos volátiles del día 60 al 90, indica que tras 60 días de maduración los compuestos que aportan el aroma típico de la Torta del Casar ya se han formado en su mayoría.

6.- Las reacciones lipolíticas tienen gran importancia en la producción de compuestos aromáticos en la Torta del Casar. Sería posible caracterizar el punto óptimo de maduración de los quesos dependiendo de su perfil de ácidos grasos libres y especialmente teniendo en cuenta la formación de ácidos grasos de cadena corta y de este modo se podría establecer el momento óptimo para el consumo en el cual ya se han formado la mayoría de los compuestos aromáticos de la Torta del Casar.

PROTEGIDO

REFERENCIAS.

Avsar, Y. K., Karagul-Yuceer, Y., Drake, M. A., Singh, T. K., Yoon, Y., & Cadwallader, K. R. (2004). Characterization of Nutty Flavor in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 1999-2010.

Barron, L.J.R., Redondo, Y., Aramburu, M., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Najera, A.I., & de Renobales, M. (2005). Variations in volatile compounds and flavour in Idiazabal cheese manufactured from ewe's milk in farmhouse and factory. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1660-1671.

Barron, L.J.R., Redondo, Y., Aramburu, M., Gil, P., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Najera, A.I., de Renobales, M., & Fernández-García, E. (2007). Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1401-1414.

Bellesia, F., Pinetty, A., Pagnoni, U., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L., & Palyi, G. (2003). Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. *Food Chemistry*, 83, 55-61.

Berard, J., Bianchi, F., Careri, M., Chatel, A., Mangia, A., & Musci, M. (2007). Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of ''Fontina Valle d'Aosta", a protected designation of origin Italian cheese. *Food Chemistry*, 105, 293-300.

Berdagué, J.L., Jeunet, R., & Grappin, R. (1987). Ripening and quality of Gruyère de Comté cheese. III: Lactic acid fermentation and levels of volatile free fatty acids in Comté cheese. *Le Lait*, 67, 249-263.

Brennand, C. P., Ha, J. K., & Lindsay, R. C. (1989). Aroma properties thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and meat lipids. *Journal of Sensory Studies*, 4, 105-120.

Cáceres, P., Castillo, D., & Pizarro, M. (1997). Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterizacion of Micrococcaceae. *International Dairy Journal*, 7, 531-536.

Carbonell, M., Núñez, M., & Fernández-García, E. (2002a). Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Le Lait*, 82, 683-698.

Carbonell, M., Núñez, M., & Fernández-García, E. (2002b). Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese. *Le Lait* ,82, 699-711.

Carpino, S., Mallia, S., La Terra, S., Melilli, C., Licitra, G., Acree, T. E., Barbano, D. M., & Van Soest, P. J. (2004). Composition and Aroma Compounds of Ragusano Cheese: Native Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science*, 87, 816-830.

Coda, R., Brechany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2006). Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 89, 4126-4143.

Correa Lelles Nogueira, M., Luachevsky, G., & Rankin, S.A. (2005). A study of volatile composition of Minas cheese. *Lebensm Wiss Technol*, 38, 555-563.

Curioni, P.M.G., & Bosset, J.O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 959-984.

de Frutos, M., Sanz, J., & Martinez-Castro, J. (1991). Characterization of artisanal cheeses by GC/MS analysis of their medium volatile (SDE) fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 524-530.

Di Cagno, R., Banks, J., Sheehan, L., Fox, P. F., Brechany, E. Y., Corsetti, A., & Gobbetti, M. (2003). Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 961-972.

Dufosse, L., Latrasse, A., & Spinnler, H.E. (1994). Importance of lactones in food flavours: structure, distribution, sensory properties and biosynthesis. *Sciences de Aliments*, 14, 17-50.

Dunn, H.C., & Lindsay R.C. (1985). Evaluation of the role of microbial Strecker derived aroma compounds in unclean-type flavours of Cheedar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 2859-2874.

Fernández-Garcia, F. (1996). Use of headspace sampling in the quantitative analysis of artisanal Spanish cheese aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1833-1839.

Fernández-García, E., Carbonell, M., & Nuñez, M. (2002a). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese, 1. Comparison of raw and pasteurised milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 69, 579-593.

Fernández-García, E., Carbonell, M., & Nuñez, M. (2002b). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese 2. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, 69, 595-604.

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., & Núñez, M. (2004a). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14, 39-46.

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., & Núñez, M. (2004b). Evolution of the volatile components of ewes' raw milk Zamorano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14, 701-711.

Fernandez-Salguero, J., & Sanjuan, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177-183.

Fox, P. F., & Wallace, J. M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17-85.

Gómez-Ruiz, J.A., Ballesteros, C., González Viñas, M.A., Cabezas, L., & Martínez-Castro, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82, 613-628.

Gripon, J. C., Monnet, V., Lamberet, G., & Desmazeaud, M. J. (1991). Microbial enzymes in cheese ripening. In P. F. Fox (Ed.), *Food enzymes* (pp. 131-168). London: Elsevier Applied Science.

Guillén, M.D., Ibargoitia, M.L., Sopelana, P., Palencia, G., & Fresno, N. (2004). Components Detected by Means of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Headspace of Artisan Fresh Goat Cheese Smoked by Traditional Methods. *Journal of Dairy Science*, 87, 284-299.

Hayaloglu, A.A., & Brechany, E. Y. (2007). Influence of milk pasteurization and scalding temperature on the volatile compounds of Malatya, a farmhouse Halloumi-type cheese. *Le Lait*, 87, 39-57.

Izco, J. M., & Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry*, 70, 409-417.

Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solidphase microextraction on food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.

Kinsella, J. E. (1975). Butter flavor. *Food Technology*, 29, 82-98.

Kraggerud, H., Skeie, S., Høy, M., Røkke, L., & Abrahamsen, R.K. (2008). Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during maturation. *International Dairy Journal*, 18, 801-810.

Kuzdzal-Savoie, S. (1980). Determination of free fatty acids in milk and milk products. International Dairy Federation. *Annual Bulletin,* 118, 53-66.

Larrayoz, P., Addis, M., Gauch, R., & Bosset, J. O. (2001). Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 11, 911-926.

Lawlor, J. B., Delahunty, C. M., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J. (2001). Relationships between the sensory characteristics, neutral volatile composition and gross composition of ten cheese varieties. *Le Lait*, 81, 487-507.

Lecanu, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Gratadoux, J.J., & Feigenbaum, A. (2002). Optimization of headspace soli-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3810-3817.

Lee, J.H., Diono, R., Kim, G.Y., & Min, D. (2003). Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1136-1140.

Lemieux, L., & Simard, R.E. (1992). Bitter flavour in dairy products. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait*, 72, 335-382.

Mallia, S., Fernández García, E., & Olivier Bosset, J. (2005) Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15, 741-758.

Mariaca, R. G., Fernández García, E., Mohedano, A. F., & Nuñez, M. (2001). Volatile fraction of ewe's milk semi-hard cheese manufactured with and without the addition of a cysteine proteinase. *Food Science and Technology*, 212, 239-246.

Martinez-Castro, I., Sanz, J., Amigo, L., Ramos, M., & Martínez-Alvarez, P. (1991). Volatile components of Manchego cheese. *Journal of Dairy Research*, 58, 239-246.

McSweeney, P.L.H., & Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293-324.

Moio, L., & Addeo, F. (1998). Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, 65, 317-333.

Molimard, P., & Spinnler, H. (1996). Review: compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.

Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Ferreira, M. A. (2003). Quantification of Short-Chain Free Fatty Acids in "Terrincho" Ewe Cheese: Intravarietal Comparison. *Journal of Dairy Science*, 86, 3102-3109.

Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845-872.

Poullet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., & Larriba, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 60, 123-127.

PROOF ONLY

Poullet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., & Larriba, G. (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *Journal of Dairy Research*, 58, 231-238.

Rothe, M., Woelm, G., Tunger, L., & Siebert, H. J. (1972). Schwellenkonzentration von Aromastoffen und ihre Nutzungzur Auswertung von Aromaanalysen. *Nahrung*, 16, 483-495.

Rychlik, M., & Bosset, J.O. (2001). Flavor and off-flavour compounds of Swiss-Gruyère cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal*, 11, 903-910.

Sieber, R., Buetikofer, U., & Bosset, J. O. (1995). Benzoic acidas a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Journal of Reproductive Medicine*, 40, 227-246.

Siek, T. J., Albin, I. A., Sather, L. A., & Lindsay, R. C. (1971). Comparison of flavour thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones. *Journal of Dairy Science*, 54, 1-4.

Stadhouders, J., & Veringa, H. A. (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 27, 77-91.

Steffen, C., Flueckiger, E., Bosset, J. O., & Ruegg, M. (1987). Swisstype varieties. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 93-120). London: Elsevier Applied Science.

Tavaria, F. K., Silva Ferreira, A. C., & Malcata, F. X. (2004). Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 4064-4072.

Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3, 389-422.

Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5, 887-903.

Urbach, G. (1997). The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. In B.A. Law (Ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (pp 253-298). London, UK: Blackie Academic and Professional.

Ur-Rehman, S., Banks, J.M., Bechany, E.Y., Muir, D.D., McSweeney, P.L.H, & Fox, P.F. (2000) Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 55-65.

Villaseñor, M.J., Valero, E., Sanz, J., & Martínez- Castro, I. (2000). Analysis of volatile compounds of Manchego cheese by dynamic headspace followed by automatic thermal desorption-GCMS. *Milchwissenschaft*, 55, 378-382.

Wilkes, J.G., Conte, E.D., Kim Y., Holcomb, M., Sutherland, J.B., & Miller, D.W. (2000). Sample preparation for the analysis of flavours and off-flavours in foods. *Journal of Chromatography A*, 880, 3-33.

Woo, A. H., & Lindsay, R. C. (1982). Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 65, 1102-1109.

Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavor formation by amino acids catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.

Zerfiridis, G. K., Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., & Lipoulou-Tzanetaki, E. (1984). Changes during ripening of commercial Gruyère Cheese. *Journal of Dairy Science*, 67, 1397-1405.

PROTOTIPO

Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., & Verzera, A. (2005). Characterization of ‘‘Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, 15, 585-593.

PROYECTO INTERNO