



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DIELÉCTRICOS EN ALIMENTOS CON ESTRUCTURA COLOIDAL

TESIS DOCTORAL

PRESENTA

JOSÉ VELÁZQUEZ VARELA

DIRECTORES

DR. PEDRO J. FITO SUÑER

DRA. MARTA CASTRO GIRÁLDEZ

Abril 2014

AGRADECIMIENTOS

Te doy gracias Dios por darme todo lo que tengo, nada me falta.

Seré breve, sin embargo como el tiempo es relativo, tardare algunos segundos más.

Agradezco la labor de mis directores de tesis; quiero agradecer a Pedro J. su confianza y apoyo durante estos intensos años, por ayudarme y animarme durante la redacción de esta tesis. A Marta, por su gran experiencia y por ayudarme siempre que lo he necesitado. A los dos, por su aprecio, cariño, amistad y por su gran ayuda; por haber estado siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos, gracias por todo, de verdad.

A todas las personas que de una u otra forma han contribuido durante estos años, por su predisposición y ayuda, gracias por todo lo que hemos vivido juntos. A mis dos mejores proyectandos, Jessica y Carlos, porque gracias a vosotros pude superar aquellos momentos tan duros y avanzar en esta tesis, muchas gracias. Al resto de alumnos, compañeros y también amigos, porque gracias a vosotros aprendí mucho, porque siempre estaban ahí para escucharme y darme ánimos, por haberme ayudado en mis comienzos, por atenderme siempre con una sonrisa, por comprenderme.

Al resto de componentes del Instituto que no puedo nombrar personalmente por cuestiones de espacio, por su paciencia y palabras de ánimo.

A mi hijo, por tu cariño, por quererme tanto sabes que lo eres todo para mí. A mis padres, por darme todo el apoyo, a ustedes les debo lo que soy. A mi hermana, porque siempre me escucha. A mi familia, porque soy tan dichoso de tenerlos a todos, no tengo palabras suficientes para escribirlo aquí, en este papel.

Thank you!

RESUMEN

En la última década, la evolución del mercado ha obligado a las industrias alimentarias a mantener unos estándares de calidad, condicionando a las empresas a mejorar sus métodos y/o técnicas de control, así como, la disminución en los costes de producción. En este contexto se hacen necesarios nuevos sistemas de control y/o monitorización en línea no destructivos, que permitan obtener la información necesaria, para mantener la calidad del producto.

En este sentido, la presente tesis estudia el uso de la espectroscopia dieléctrica en radiofrecuencia y microondas, como técnica para obtener información de las propiedades físicas, químicas y estructurales del alimento durante su proceso de fabricación. Esta información, conjuntamente con modelos fenomenológicos expuestos en esta tesis, permite desarrollar algoritmos de control, en la producción de alimentos con estructuras complejas.

En primer lugar se realizó una revisión bibliográfica de esta metodología (espectroscopia dieléctrica), y los ejemplos de su aplicación, para obtener las bases necesarias que permitieron orientar la investigación para esta tesis. La revisión bibliográfica incluye numerosos estudios que demuestran las ventajas de utilizar la espectroscopia dieléctrica en productos alimenticios complejos, como: carnes, vegetales, frutas, productos lácteos, etc. En todos ellos, se ha demostrado la versatilidad y utilidad de la información proporcionada por esta técnica, permitiendo llevar a

cabo determinaciones en línea no destructivas, altamente fiables y de gran sensibilidad; obteniendo como resultado la reducción de los tiempos operativos y de los costes de producción.

En segundo lugar se estudió el proceso de fermentación en la elaboración de cerveza, se analizaron las propiedades dieléctricas durante la etapa de fermentación, conjuntamente con diversas propiedades físicas y químicas. Los resultados obtenidos mostraron que la dispersión γ , inducida por el contenido y movilidad del agua, varía en función de la proporción de etanol y de azúcares, ya que interfieren en el movimiento del agua. Queda demostrado que dicha técnica puede ser usada como un método de monitorización rápido, preciso y no destructivo en la fabricación de cerveza.

En tercer lugar se realizó el estudio y análisis del proceso de salado de queso. Se analizó el transporte de agua, cloro, sodio y calcio durante el salado de queso en salmuera saturada, usando un modelo termodinámico. Se determinó, la humedad, la actividad de agua, las propiedades dieléctricas y el volumen durante el tratamiento y después del periodo de reposo. Se desarrolló un modelo termodinámico no lineal irreversible, para determinar el transporte de agua e iones a través de la estructura del queso, obteniendo un coeficiente fenomenológico de $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ J}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. El modelo describe varios fenómenos que ocurren durante el proceso de salado. Se desarrolló un modelo no lineal para describir el efecto de la movilidad de cargas sobre la conductividad iónica, que

permite predecir el nivel de salado en la superficie y en el interior, así como la salida de calcio del sistema, con los consiguientes cambios estructurales.

Por último se realizó el estudio y análisis de geles de colágeno a distintos grados de concentración. Ha sido posible detectar dos niveles conformacionales del colágeno en función de su relación con el agua, mediante el análisis de las propiedades dieléctricas en el espectro de la radiofrecuencia y las microondas. Se ha desarrollado un algoritmo de análisis de espectros basados en la modelización de Gompertz, que permite de manera rápida y fiable obtener los parámetros a las frecuencias de relajación de las dispersiones α , β y γ . Los resultados demostraron la utilidad de propiedades dieléctricas como sistema de control en la formulación de geles.

En conclusión, la investigación realizada en esta tesis aborda el estudio de distintas estructuras coloidales, mediante modelizaciones termodinámicas y espectroscopia dieléctrica en radiofrecuencia y microondas. Dichos estudios muestran la viabilidad de dicha técnica en la monitorización no destructiva y fiable de los procesos de fabricación expuestos en el trabajo.

RESUM

En la última dècada el mercat ha obligat a les indústries alimentàries a mantenir uns estàndards de qualitat, condicionant a les empreses a millorar els seus mètodes i/o tècniques de control, així com, minvar els costos de producció. En aquest context es fan necessaris nous sistemes de control i/o monitorització en línia no destructius, que permeten obtenir la informació necessària, per tal de mantenir la qualitat del producte reduint els costos de producció.

En aquest sentit, la present tesi estudia l'ús de l'espectroscòpia dielèctrica en radiofreqüència i microones, com a tècnica per obtenir propietats físiques, químiques i estructurals de l'aliment durant el procés de fabricació. Aquesta informació, junt amb els models fenomenològics exposats en aquesta tesi, permeten analitzar paràmetres de control, en la producció d'aliments amb estructures complexes.

En primer lloc es va realitzar una revisió bibliogràfica d'aquesta metodologia (espectroscòpia dielèctrica), i els exemples de la seua aplicació per tal d'obtenir les bases necessàries que van permetre orientar la investigació per a aquesta tesi. La revisió bibliogràfica inclou nombrosos estudis alimentaris complexos, com: carns, vegetals, fruites, productes lactis, etc. En tots aquests, s'ha demostrat la versatilitat i la utilitat de la informació proporcionada per aquesta tècnica, permetent dur a terme determinacions en línia no destructives, altament fiables i de gran

sensibilitat; obtenint-se com a resultat la reducció dels temps operatius i dels costos de producció.

En segon lloc s'estudià el procés de fermentació en l'elaboració de la cervesa, s'analitzaren les propietats dielèctriques durant l'etapa de fermentació, conjuntament amb diverses propietats físiques i químiques. Els resultats obtinguts mostraren que la dispersió γ , induïda pel contingut i mobilitat de l'aigua, varia en funció de la proporció d'etanol i sucres, ja que interfereixen en el moviment de l'aigua. Queda demostrat que dita tècnica pot ser utilitzada com un mètode de monitorització ràpid, precís i no destructiu en la fabricació de la cervesa.

En tercer lloc es va realitzar l'estudi i anàlisi del procés de salat de formatge. S'analitzà el transport d'aigua, clor, sodi i calci durant el salat de formatge en salmorra saturada, emprant un model termodinàmic. Es determinà la humitat, l'activitat d'aigua, les propietats dielèctriques i el volum durant el tractament i després del període de repòs. Es desenvolupà un model termodinàmic no lineal irreversible, per tal de determinar el transport d'aigua i ions a través de l'estructura del formatge, obtenint el coeficient fenomenològic de $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ J}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. El model descriu diversos fenòmens que es donen lloc durant el procés de salat. Es desenvolupà un model lineal per descriure l'efecte de la mobilitat de les càrregues sobre la conductivitat iònica, que permet predir el nivell de sal en la superfície i a

l'interior, així com l'eixida del calci del sistema, amb els consegüents canvis estructurals.

Finalment es realitzà l'estudi i anàlisi de gels de col·lagen a diferents graus de concentració. Ha sigut possible detectar dos nivells conformational del col·lagen en funció de la seua relació amb l'aigua, mitjançant l'anàlisi de les propietats dielèctriques en l'espectre de la radiofreqüència i les microones. S'ha desenvolupat un algoritme d'anàlisi d'espectres basats en la modelització de Gompertz, que permet de forma ràpida i fiable obtenir paràmetres a les freqüències de relaxació de les α , β i γ . Els resultats demostraren la utilitat de les propietats dielèctriques com a sistema de control en la formulació de gels.

En conclusió, la investigació realitzada en aquesta tesi tracta l'estudi de diferents estructures col·loïdals, mitjançant modelitzacions termodinàmiques i espectroscòpia dielèctrica en radiofreqüència i microones. Dits estudis mostren la viabilitat de dita tècnica en la monitorització no destructiva i fiable dels processos de fabricació exposats al treball.

ABSTRACT

In the last decade, the evolution of the market has forced food industries to maintain quality standards, conditioning companies to improve their methods and/or control techniques, as well as decreasing production costs. In this context, new non-destructive systems for on line monitoring, are necessary to obtain the needed information to maintain the quality of the product while reducing the production costs.

In this sense, this thesis studies the use of dielectric spectroscopy in the radiofrequency and microwave range, as a technique to obtain physical, chemical and structural properties of food during its manufacturing process. This information, together with phenomenological models proposed in this thesis, allow analysing control parameters in the production of food with complex structures.

First, a review of this methodology (dielectric spectroscopy) and examples of its application were made to obtain the needed basis for focusing the research for this thesis. The literature revision includes several studies showing the benefits of using dielectric spectroscopy in complex food products such as meats, vegetables, fruits, dairy products, etc. In all cases, the versatility and usefulness of the information provided by this technique has been demonstrated, allowing us to carry out non-destructive measurements and highly reliable, obtaining as a result the reduction of operating times and cost of production.

Secondly, the fermentation process was studied in brewing; the dielectric properties were analyzed during the fermentation step, together with various physical and chemical properties. The results showed that the γ -dispersion, induced by water mobility and water content, varies depending on the proportion of ethanol and sugar, as it interferes with the movement of water molecules. It is demonstrated that this technique can be used as a rapid, accurate and non-destructive method for monitoring the fermentation process.

In third place, a study and analysis of salting cheese process was made. The fluxes of water, chloride, sodium and calcium were analyzed during salting cheese in saturated brine using a thermodynamic model. Moisture, water activity, dielectric properties and volume were determined during treatment and after the repose time. Nonlinear irreversible thermodynamic model was developed to determine the transport of water and ions in the structure of the cheese, giving a phenomenological coefficient of $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{J}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$. The model describes several phenomena that occur during the salting process. This model describes the effect of the mobility of charges on the ionic conductivity, which not only allows predicting the level of salt in the surface and inside, but also the output of calcium from the system, with the resulting structural changes.

Finally, a study and analysis of collagen gels at different concentration levels was made. It has been possible to detect two

conformational levels of collagen in terms of its relationship with the water, through an analysis of the dielectric properties in the spectrum of the radio frequency and microwave range. It has developed an algorithm analysis based on Gompertz model for spectra, which enables, in a fast and reliable way, obtaining the parameters of relaxation frequencies of dispersions α , β and γ . The results showed the usefulness of dielectric properties as a control system in the formulation of gels.

In conclusion, the research conducted in this thesis centres on the study of different colloidal structures by thermodynamic modelling and dielectric spectroscopy in radiofrequency and microwave range. These studies show the viability of the technique for non-destructive and reliable monitoring of the manufacturing processes exposed in this work.

Índice general

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Justificación.....	1
1.2	Teoría de espectros dieléctricos.....	2
1.2.1	Principios básicos.....	2
1.2.2	Mecanismos dieléctricos en sistemas alimentarios.....	8
1.2.3	Modelo de Debye.....	14
1.3	Niveles estructurales de los alimentos.....	18
1.3.1	Estructura y microestructura de sistemas coloidales.....	20
1.4	Transiciones de fase.....	23
1.4.1	Transiciones en sistemas proteicos.....	26
1.5	Termodinámica de los sistemas complejos.....	28
1.6	Procesos industriales estudiados.....	32
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	40
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
2.3	PLAN DE TRABAJO.....	39
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1	Materia prima.....	44
3.2	Medida de las propiedades dieléctricas.....	45
3.3	Determinación de las propiedades fisicoquímicas.....	50
3.4	Microscopia electrónica de barrido a bajas temperaturas.....	55
3.5	Estudio de la medida de los espectros dieléctricos en cerveza.....	56
3.6	Estudio de la cinética de salado de queso mediante la utilización de espectros dieléctricos.....	60
3.7	Estudio de los espectros dieléctricos de geles de colágeno.....	64
4	RESULTADOS.....	68
4.1	La utilización de sensores basados en la espectroscopia dieléctrica como una buena herramienta para asegurar la calidad y seguridad alimentaria.....	70
4.2	Control of the brewing process by using microwaves dielectric spectroscopy.....	70
4.3	Thermodynamic analysis of salting cheese process.....	104
4.4	Analysis of dielectric properties in the salting cheese process at microwave frequency range.....	130
4.5	Structural analysis of collagen gel by dielectric spectroscopy in radiofrequency and microwaves range.....	152
5	CONCLUSIONES GENERALES.....	154
6	BIBLIOGRAFÍA.....	172
7	ANEXOS.....	200

Índice de figuras

Figura 1.2.1 Esquema del espectro electromagnético.	4
Figura 1.2.2 Esquema del desplazamiento de un campo eléctrico con el efecto sobre la permitividad (izquierda) y el desplazamiento de un campo magnético con el efecto sobre la permeabilidad.	6
Figura 1.2.3 Representación ideal de la permitividad y conductividad en sistemas biológicos en función de la frecuencia (adaptado de Castro-Giráldez et al, 2010).	10
Figura 1.2.4 Esquema resumen de todos los fenómenos que se producen en el rango de frecuencias entre Hz y GHz.	14
Figura 1.2.5 Representación de las pérdidas dipolares y la constante dieléctrica del agua a 20°C en función del logaritmo de la frecuencia siguiendo el modelo ideal de Debye (adaptado de Debye, 1929).	16
Figura 1.2.6 Representación del diagrama Cole&Cole (Cole y Cole, 1941).	17
Figura 1.2.7 Representación del modelo de Debye y el diagrama Cole&Cole para sistemas electrolíticos (Shubert y Regier, 2005).	18
Figura 1.3.1 Modelo morfológico de un glóbulo de grasa (adaptado de Aguilera y Stanley, 1999)	23
Figura 1.4.1 Representación esquemática del diagrama de estado típico de los estados de fase. Adaptado de Martínez-Navarrete et al. (2000).	24
Figura 1.6.1. Proceso de fabricación de cerveza (adaptado de Enciclopedia Británica, Inc. 2010).	33
Figura 1.6.2 Proceso de fabricación de queso.	36
Figura 3.2.1 Sonda coaxial Agilent 85070E y analizador de redes Agilent E8362B.	46
Figura 3.2.2 Esquema de la sonda Slim Form Probe Agilent E85070 (Agilent Technologies, 2005).	47
Figura 3.2.3 kit de calibración de la sonda coaxial (Agilent Technologies, 2005).	47
Figura 3.2.4 Analizador de impedancias Agilent 4294A y platos paralelos Agilent 16451B.	48
Figura 3.2.5 Método de contacto directo de la muestra con los dos electrodos (placas) de metal (Agilent Technologies, 2000).	49
Figura 3.2.6 Detalle del electrodo B (Agilent Technologies, 2000).	49
Figura 3.3.1 Detalle del montaje utilizado para la obtención de la superficie a) y espesor b) de las muestras de queso.	51
Figura 3.3.2 Equipo para medir la actividad de agua (a_w).	52
Figura 3.3.3 Refractómetro ABBE ATAGO, 3-T.	54
Figura 3.5.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de cerveza.	58
Figura 3.6.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de salado de queso.	61
Figura 3.6.2 Detalle de la operación de la cinética de salado en cámara refrigerada a 4°C.	63
Figura 3.7.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de geles.	65

Índice de tablas

Tabla 1.1 Clasificación de sistemas coloidales.....	21
Tabla 3.1 Composición de las disoluciones modelo de agua y azúcares.	56
Tabla 3.2 Composición de las disoluciones modelo de agua, etanol y azúcares.....	57
Tabla 3.3 Composición de los geles patrón; agua y colágeno empleadas en el presente estudio.....	66

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

La industria alimentaria es un pilar fundamental de la economía mundial y gana importancia cada año. Este sector tiene un volumen de ventas de unos 900 mil millones de euros (más del 14 % del total de la industria) y proporciona empleo a más de 4 millones de trabajadores, siendo el sector principal dentro del conjunto de la industria (FAO, 2012). En la última década, la evolución del mercado ha obligado a las industrias alimentarias a mantener unos estándares de calidad, condicionando a las empresas a mejorar sus métodos y/o técnicas de control, así como, a disminuir los costes de producción. Por lo tanto, se hacen necesarios nuevos sistemas de control y/o monitorización en línea no destructivos, que permitan obtener la información necesaria, para mantener la calidad del producto reduciendo los costes de producción. En este contexto, la aplicación de la espectroscopia dieléctrica para el control y/o monitorización de determinados procesos alimentarios presenta un gran potencial (Skierucha et al., 2012).

Durante los últimos años, la espectroscopia dieléctrica ha experimentado un avance importante entre los innovadores métodos de medida utilizados para la interpretación física y química en materiales y sistemas biológicos, ofreciendo en muchos casos, información única sobre los procesos y el estado en que se encuentran los componentes del alimento (Castro-Giráldez, 2010; Jha et al., 2011; Skierucha et al., 2012; Sosa-Morales et al., 2010).

Las propiedades dieléctricas en sistemas biológicos han sido principalmente utilizadas para la predicción del comportamiento de los sistemas cuando se utilizan tratamientos de calentamiento por microondas, también han sido utilizadas como un método rápido para la determinación de humedad (Venkatesh y Raghavan, 2005). Aunque las propiedades dieléctricas de algunos alimentos se pueden encontrar en diversas fuentes bibliográficas, la mayoría de los datos se encuentran publicados para especies químicas puras (Venkatesh y Raghavan, 2004).

Esta tesis estudia el uso de la espectroscopia dieléctrica en radiofrecuencia y microondas, como técnica para obtener propiedades físicas, químicas y estructurales del alimento durante su proceso de fabricación. Esta información, conjuntamente con los modelos fenomenológicos expuestos en esta tesis, permite monitorizar la transformación de estructuras alimentarias complejas.

1.2 Teoría de espectros dieléctricos

1.2.1 Principios básicos

La espectroscopia dieléctrica es la técnica que describe las propiedades eléctricas de un flujo de fotones al atravesar un medio. Un flujo de fotones genera interacciones eléctricas y magnéticas, el efecto de ambas viene definido por las relaciones de Maxwell. El fotón es la partícula elemental que transmite la fuerza electromagnética, dicha fuerza se produce por la vibración

transversal (eléctricas) y longitudinal (magnéticas) de los fotones en movimiento. Por esta razón, en función de la trayectoria del flujo de fotones se maximiza más la fuerza eléctrica o la magnética. Tanto el fotón como el gluon son bosones (partículas transmisoras de fuerza universal) que no tienen interacción con el campo de Higgs, por esta razón son partículas carentes de masa y se mueven a la máxima velocidad a la que se puede mover una partícula elemental, $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Las interacciones eléctricas dependen del nivel de energía del flujo de fotones que generan la fuerza, y se podrán dividir en dos mecanismos de interacción. Un fotón con poca energía tendrá una vibración leve y, por ende, una frecuencia de vibración baja (Hz-GHz). El efecto sobre la materia será leve, y las interacciones estarán asociadas a la resonancia de las ondas producidas por la vibración del fotón; estas interacciones serán de orientación y de inducción molecular. En cambio, los fotones con mucha energía vibrarán intensamente a una elevada frecuencia (THz-ZHz). El efecto sobre la materia será mayor cuanto mayor sea el nivel de energía del flujo de fotones. Los mecanismos que se producen son de partícula y están asociados a la colisión de los fotones con las partículas elementales que forman las moléculas. En un primer tramo, los fotones colisionarán con los electrones de valencia, aumentando su energía, y por tanto aumentando su orbital. En un segundo nivel, de mayor energía, la colisión producida generará un desplazamiento de los electrones de valencia fuera del orbital, dejando radicales libres en el medio; a partir de este nivel de

energía, la radiación se denomina “irradiación”. Al ir aumentando la energía del flujo de fotones incidentes sobre la materia, las interacciones pueden alcanzar el desplazamiento de partículas elementales pertenecientes al núcleo, este fenómeno se denomina “efecto Compton”.

Esta tesis se basa en las interacciones de baja energía, comprendida entre Hz y GHz. Las especies químicas afectadas a estas frecuencias son moléculas dipolares (agua), macromoléculas con cargas (proteínas), electrolitos (iones) y, en general, moléculas cargadas o polares (McGrum et al., 1991).

En la Figura 1.2.1, se muestran las diferentes regiones del espectro electromagnético, donde se puede observar que las regiones estudiadas en esta tesis, radiofrecuencia y microondas, se encuentran delimitadas a frecuencias altas por los infrarrojos (Shukla y Anantheswaran, 2001).

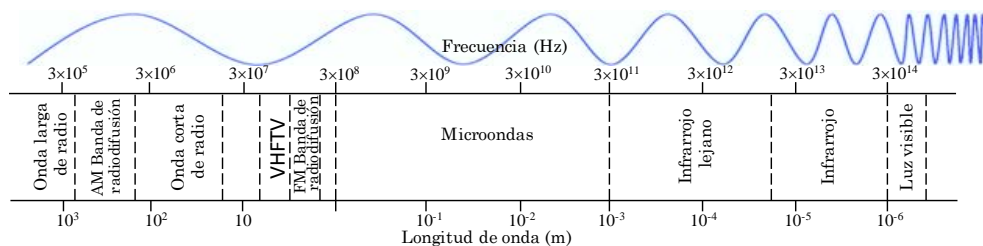


Figura 1.2.1 Esquema del espectro electromagnético.

Desde un punto de vista general, según el modelo estándar de partículas, la fuerza electromagnética se explica por el efecto del flujo de fotones a través del material no conductivo. Para explicar el efecto principal del campo eléctrico, es importante saber que el

motor de esta fuerza es una diferencia de tensión en el sistema, mientras que en el campo magnético es la intensidad de la corriente de carga. A nivel macroscópico este fenómeno (eléctrico y magnético) se describe por las relaciones de Maxwell (ecuaciones 1.1).

$$\nabla \bar{E} = \frac{-\partial \bar{B}}{\partial t} - \bar{M} \quad (\text{Ecuación 1.1a})$$

$$\nabla \bar{H} = \bar{J} + \frac{\partial \bar{D}}{\partial t} \quad (\text{Ecuación 1.1b})$$

$$\nabla \bar{D} = \rho \quad (\text{Ecuación 1.1c})$$

$$\nabla \bar{B} = 0 \quad (\text{Ecuación 1.1d})$$

Donde E es el campo eléctrico, B es el desplazamiento del campo magnético, M es la densidad de corriente magnética, H es el campo magnético, D es el desplazamiento del campo eléctrico, J es la densidad de corriente eléctrica y ρ es la densidad de carga eléctrica.

En un medio dieléctrico, se produce resistencia al flujo de fotones, y esta resistencia produce un desplazamiento en el campo eléctrico y magnético (ver figura 1.2.2), matemáticamente se expresa como:

$$\bar{D} = \varepsilon^* \cdot \varepsilon_0 \cdot E = (\varepsilon' - j\varepsilon'') \varepsilon_0 \cdot E \quad (\text{Ecuación 1.2a})$$

$$\bar{B} = \mu^* \cdot \mu_0 \cdot H = (\mu' - j\mu'') \mu_0 \cdot H \quad (\text{Ecuación 1.2b})$$

Donde la permitividad compleja (ε^*) representa la propiedad física que explica la respuesta del medio a un campo eléctrico

externo aplicado y la permeabilidad compleja (μ^*) representa la propiedad física que explica la respuesta del medio a un campo magnético.

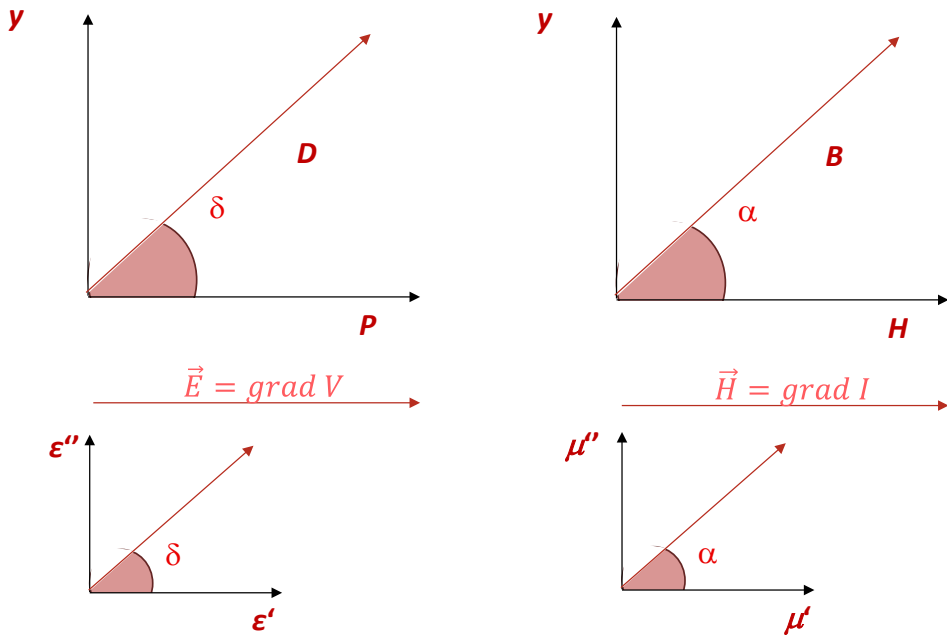


Figura 1.2.2 Esquema del desplazamiento de un campo eléctrico con el efecto sobre la permitividad (izquierda) y el desplazamiento de un campo magnético con el efecto sobre la permeabilidad.

La cantidad y distribución de la energía eléctrica absorbida por el sistema analizado puede ser explicada mediante las ecuaciones de Maxwell (ecuaciones 1.1). Cuando un flujo de fotones circula a través de un sistema, parte se refleja, parte se transmite y parte se absorbe. La proporción de energía absorbida se define a través de las propiedades dieléctricas y magnéticas. La propiedad eléctrica fundamental a través de la cual se describe la interacción con la materia, que induce la absorción de energía, es la

permitividad ε^* , y se expresa matemáticamente como un vector (ver figura 1.2.2):

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Donde ε' es la constante dieléctrica y ε'' el factor de pérdidas.

De tal manera que la constante dieléctrica (ε') representa la proporción de energía eléctrica que es almacenada al orientarse el medio respecto a la dirección del campo, y el factor de pérdidas (ε'') representa el desplazamiento del campo inducido por las transformaciones de energía eléctrica en otras energías, por colisiones y fricciones entre moléculas. Por tanto, los valores de la permitividad compleja son diferentes en cada sistema, debido a los estados de agregación (sólido, líquido y gaseoso) de la materia y fundamentalmente al ordenamiento estructural del mismo. Por lo general, la permitividad compleja tiene valores altos pero se expresa en relación con el valor en el vacío, denominándola como la permitividad relativa de un sistema ε_r . Esta permitividad es igual a $\varepsilon_{abs}/\varepsilon_0$, donde ε_{abs} , es la permitividad absoluta del sistema (Nyfors y Vainikainen, 1989).

Cuando la permitividad compleja se representa como un simple vector en un diagrama, definiendo la parte real como la polaridad del campo y la parte imaginaria como el desplazamiento del mismo (ver figura 1.2.2). El vector resultante forma un ángulo δ con el eje real (ε'), el cual se puede describir con la siguiente ecuación.

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} = \frac{(\text{Energía perdida/ciclo})}{(\text{Energía almacenada/ciclo})} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

A menudo la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) o factor de disipación, también se utiliza como un parámetro dieléctrico descriptivo (Nelson, 1999).

1.2.2 Mecanismos dieléctricos en sistemas alimentarios

Los fenómenos de orientación se producen a frecuencias características comprendidas entre Hz y GHz, estos fenómenos identifican junto con la conductividad el comportamiento dieléctrico de los sistemas biológicos.

La dispersión alfa (α), también llamada counterion (ion contra ion), viene inducida por la orientación de cargas móviles en el medio dieléctrico. La dispersión beta (β) esta inducida por la orientación de las cargas fijas del medio, pudiéndose deber a las cargas propias de las moléculas o a cargas inducidas por interacciones entre especies químicas, fenómenos de tensión superficial (también denominado Maxwell Wagner). Por último, la dispersión gamma (γ) se produce por la orientación de dipolos de pequeño tamaño molecular, en sistemas biológicos principalmente el agua (Markx y Davey, 1999).

En la figura 1.2.3, se representan las tres dispersiones: α , β y γ para el rango de frecuencias entre 10 Hz a 100 GHz (Gabriel et al., 1996). Cada dispersión corresponde con una determinada orientación producida a una frecuencia de relajación específica.

En la figura 1.2.3, se muestra la dispersión α a bajas frecuencias (Hz-kHz). Este fenómeno está asociado a la orientación de iones en un medio fluido. En ocasiones, la orientación de iones de una carga determinada induce una respuesta de movilidad contraria en iones de carga de signo opuesto, por esta razón esta dispersión también se denomina counterion “ion contra ion” (Foster y Shwan, 1989). En sistemas celulares, un flujo de alta intensidad de fotones (campo eléctrico de alta intensidad) en el rango de frecuencia de counterion, permite la acumulación de cargas en la membrana celular (Prodan et al., 2004), membrana del retículo sarcoplásmico, o cualquier membrana de los orgánulos (Martinsen et al., 2000). Estas membranas actúan como capacitores impidiendo el paso de los iones y provocando que iones similares pero de carga distinta en el interior se acumulen formando fuerzas de atracción a través de la membrana, provocando la ruptura de la misma; estos fenómenos se denominan electroporación y electrocompresión de la membrana. También pueden afectar al funcionamiento de los canales de transporte intracelulares pasivos como los aquaporins (Stoy et al., 1982).

Kuang (1996), Kuang y Nelson (1997, 1998) asociaron esta dispersión a la capacidad eléctrica de las proteínas de transporte para provocar el movimiento de iones a través de ellas mediante el consumo de ATP (canales iónicos). También es responsable, del equilibrio eléctrico de cargas que permite mantener la polarización de la doble capa lipídica conformando las membranas (Gabriel et al., 1996; Foster y Schwan, 1996).

Por otra parte, Kuang y Nelson (1998), señalan además que las medidas a bajas frecuencias (dispersión α) permiten predecir las reacciones electroquímicas. Estas medidas se realizan mediante electrodos polarizados, controlando la reacción a lo largo del tiempo. Esto permite obtener el cambio del potencial eléctrico del medio, y con éste predecir el cambio de concentración de las especies químicas durante el proceso.

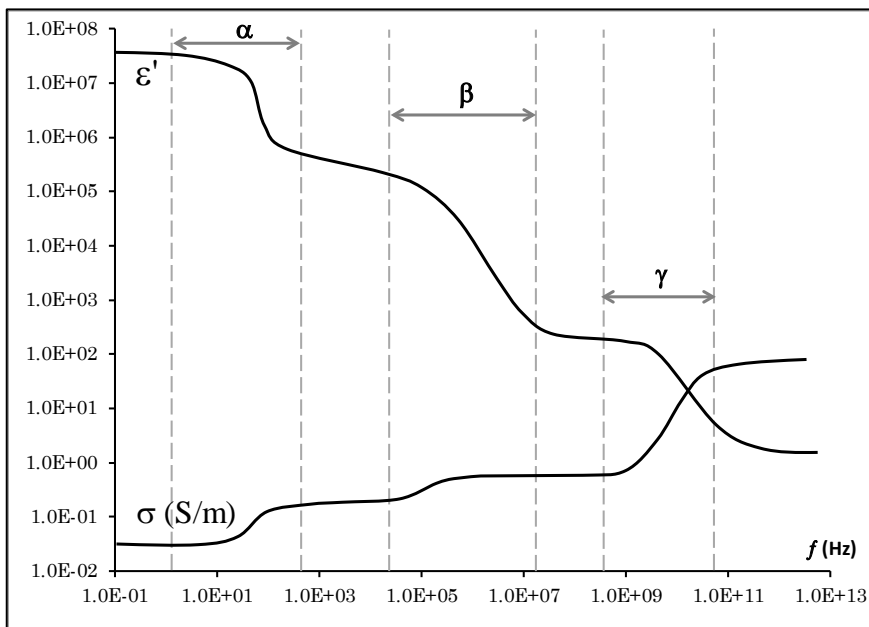


Figura 1.2.3 Representación ideal de la permitividad y conductividad en sistemas biológicos en función de la frecuencia (adaptado de Castro-Giráldez et al., 2010).

Las investigaciones realizadas por Dukhin y Shilov (1974), Chew y Sen (1982), Fixman (1983), Grosse y Foster (1987), describen la polarización β en sistemas que contienen superficies cargadas.

La dispersión β cubre un amplio rango del espectro, desde kHz hasta MHz, y describe todas las interacciones con cargas fijas o de

baja movilidad que se encuentran en el medio dieléctrico. Esta dispersión se divide a su vez en dos tramos, las interacciones en el rango de kHz, en la que se engloban las interacciones con cargas pertenecientes a macromoléculas estructurales que conforman la fase sólida del sistema, como por ejemplo las proteínas. En el tramo de mayor energía, MHz, se encuentran las interacciones de cargas asociadas a la tensión superficial de las superficies sólidas en contacto con el medio fluido, este fenómeno se denomina Maxwell-Wagner.

La mayoría de los sistemas alimentarios son de naturaleza celular o coloidal, en los que la presencia de cargas fijas es usual; por ejemplo, en forma de proteínas o de cargas superficiales necesarias para mantener la conformación coloidal. Por esta razón, la dispersión β , representa una buena herramienta para predecir el nivel estructural alimentario.

Los fenómenos interfaciales, que permiten la dispersión de una fase en el interior de otra insoluble, manteniéndola dispersa, acumulan iones de elevada fuerza iónica gracias a la tensión superficial interfacial. Dicho mecanismo describe la conformación final de la mayoría de los sistemas coloidales. Este fenómeno presenta interacciones de elevado nivel de energía, y es fruto del equilibrio eléctrico entre la tensión superficial y las cargas de las especies químicas que conforman la separación entre fases; dicho fenómeno se produce en la dispersión β (Kuang y Nelson, 1998).

La dispersión gamma (γ), fenómeno comprendido entre MHz y GHz, produce la orientación dinámica del spin de rotación de las moléculas dipolares (como por ejemplo el agua) en la dirección del campo eléctrico, y la inducción o rotación de la molécula a través del spin. Este fenómeno, al igual que las dispersiones α y β , produce una acumulación de energía eléctrica en la reorientación del spin y una transformación de parte de la energía eléctrica en otras energías, mecánicas y/o caloríficas, provocada por las colisiones y fricciones asociadas al incremento en la movilidad molecular. El espectro dieléctrico del agua líquida, presenta una fuerte relajación característica próxima a 18 GHz a 25°C (Kaatze, 1989), disminuyéndose en presencia de solutos electrolíticos y no electrolíticos (Castro-Giráldez, 2010e y 2010f).

La mayoría de los alimentos presentan una fase acuosa mayoritaria, que puede describir la mayor parte de la estructura del mismo. La molécula de agua presenta una distribución de cargas simétricas, formando los átomos de hidrógeno 108° entre ellos (zona positiva), respecto al átomo de oxígeno (zona negativa), conformando un momento dipolar permanente. Cuando se someten a un campo eléctrico, las moléculas intentan desplazarse desde sus posiciones de equilibrio para orientarse al campo eléctrico, almacenando energía que es liberada cuando cesa la aplicación del campo. La contribución de los dipolos a las pérdidas totales tiene lugar cuando aparece un desfase entre la alineación del dipolo y el campo; estas pérdidas se conocen como pérdidas dipolares. Cuando este fenómeno ocurre, el sistema transforma

parte de la energía almacenada en energías mecánicas y caloríficas (Castro-Giráldez, 2010a), dicho mecanismo es el predominante en el proceso de calentamiento inducido en los equipo de microondas.

Unido a las tres dispersiones descritas anteriormente, se produce un fenómeno resonante en las moléculas con cargas, desde iones hasta macromoléculas con muchas cargas como las proteínas, que provoca pérdidas de energía eléctrica, transformándose en calorífica y mecánica denominado conductividad (σ). Dicho fenómeno se produce en el rango comprendido entre Hz hasta 1 GHz.

$$\sigma = \varepsilon''\varepsilon_0\omega \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

Siendo ω la velocidad angular y ε_0 la permitividad del vacío ($\varepsilon_0=8.8542 \cdot 10^{-12} \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$).

En el rango de frecuencias que generan fenómenos de orientación, la permitividad desciende al aumentar la frecuencia mientras que la conductividad eléctrica aumenta (Rigaud et al., 1996). En la figura 1.2.4, se muestra un resumen de todos los fenómenos descritos anteriormente.

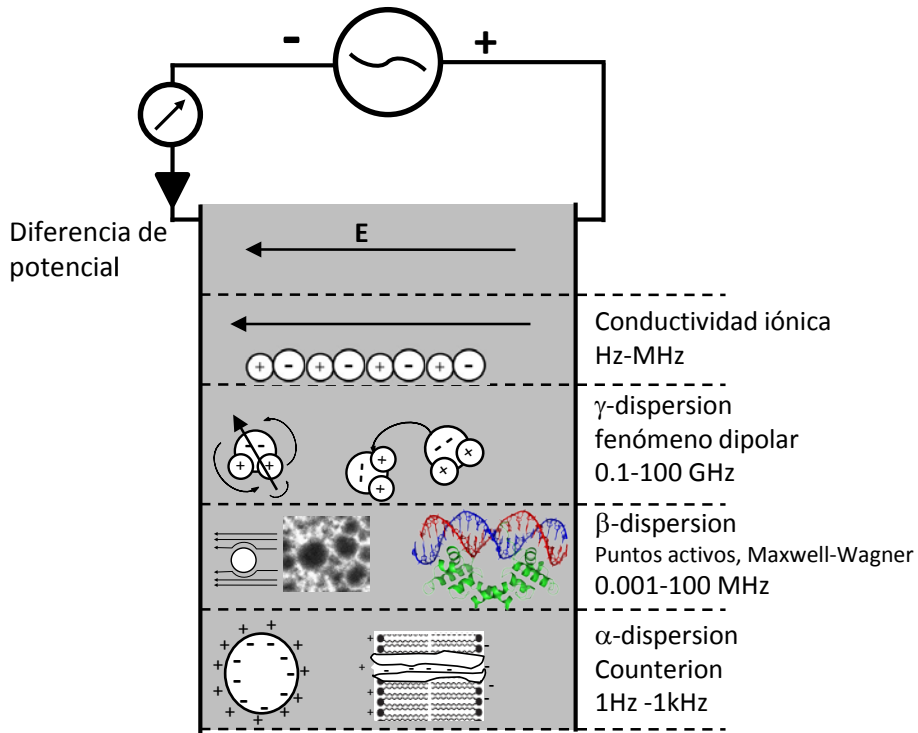


Figura 1.2.4 Esquema resumen de todos los fenómenos que se producen en el rango de frecuencias entre Hz y GHz.

1.2.3 Modelo de Debye

Para cada una de las dispersiones explicadas en el apartado anterior, el factor de pérdidas varía, matemáticamente, con el valor logarítmico de la frecuencia como una función normal (Nelson, 1973), obteniéndose un máximo a una frecuencia determinada; esta frecuencia se denomina frecuencia de relajación. Debye en 1929, desarrolló un modelo matemático, que permite ajustar cada dispersión. Este modelo fue desarrollado inicialmente para describir el comportamiento de los dipolos en

medio líquidos y en disoluciones de moléculas polares en solventes no polares (ver ecuación 1.6):

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon'' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

Dónde: ϵ_∞ es la permitividad relativa a una frecuencia muy elevada, denominada constante dieléctrica óptica; ϵ_s es la constante dieléctrica estática, y τ es el tiempo de relajación en segundos. A partir de la ecuación 1.6 del modelo de Debye (1929), se describen los términos correspondientes a la constante dieléctrica y al factor de pérdidas ecuaciones 1.7 y 1.8 (Kraszewski y Nelson, 1990):

$$\epsilon' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

$$\epsilon'' = \frac{(\epsilon_s - \epsilon_\infty) \omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

La representación gráfica es de gran utilidad para mostrar la relajación dieléctrica. En la figura 1.2.5, se muestra el comportamiento dieléctrico del agua a 20°C. En esta gráfica se puede observar que a bajas frecuencias la constante dieléctrica tiene valores cerca de 80 (Collie et al., 1948), y en altas frecuencias, la constante dieléctrica alcanza valores próximos a 6 (Mudgett, 1985). Es decir, la constante dieléctrica tiene un comportamiento sigmoideo frente al logaritmo de la frecuencia, y el factor de pérdidas tiene un comportamiento de campana de

gauss con un máximo en la frecuencia de relajación de la dispersión (Mudgett, 1985).

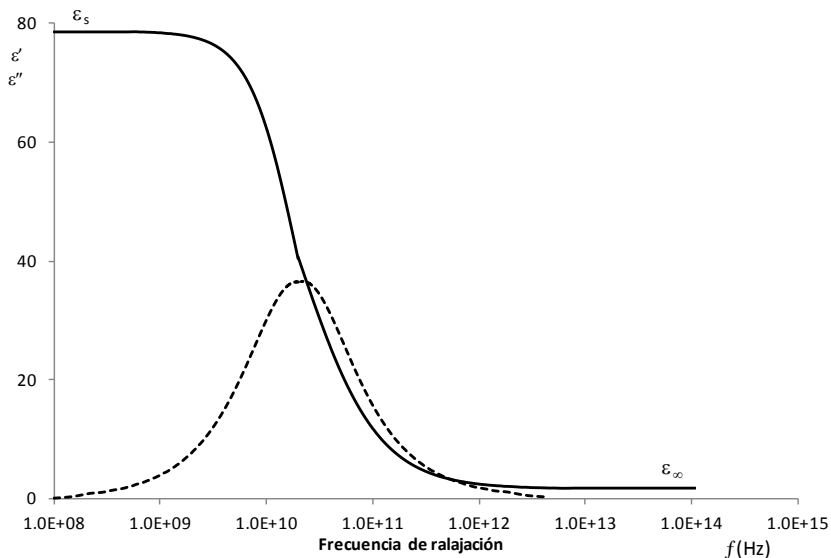


Figura 1.2.5 Representación de las pérdidas dipolares y la constante dieléctrica del agua a 20°C en función del logaritmo de la frecuencia siguiendo el modelo ideal de Debye (adaptado de Debye, 1929).

En sistemas con conductividad eléctrica, es decir medios electrolíticos o con moléculas cargadas eléctricamente, el factor de perdidas será la suma de las pérdidas debidas a la dispersión a la que se encuentre el campo eléctrico y a la conductividad del medio, de tal manera que la resultante quedará como se muestra a continuación (Shubert y Regier, 2005):

$$\epsilon'' = \frac{(\epsilon_s - \epsilon_\infty) \omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega} \tag{Ecuación 1.9}$$

Es posible relacionar la constante dieléctrica con el factor de pérdidas, dicha representación se denomina Cole & Cole. Esta

representación consiste en situar el factor de pérdidas en el eje vertical y la constante dieléctrica en el eje horizontal (Figura 1.2.6). Al representar el gráfico Cole & Cole de un sistema con una única frecuencia de relajación y sin conductividad, se obtendrá un semicírculo cuyos puntos de corte con el eje de abscisas a baja frecuencia son ($\epsilon' = \epsilon_s$, $\epsilon'' = 0$), y a alta frecuencia son ($\epsilon' = \epsilon_\infty$, $\epsilon'' = 0$) (Cole y Cole, 1941).

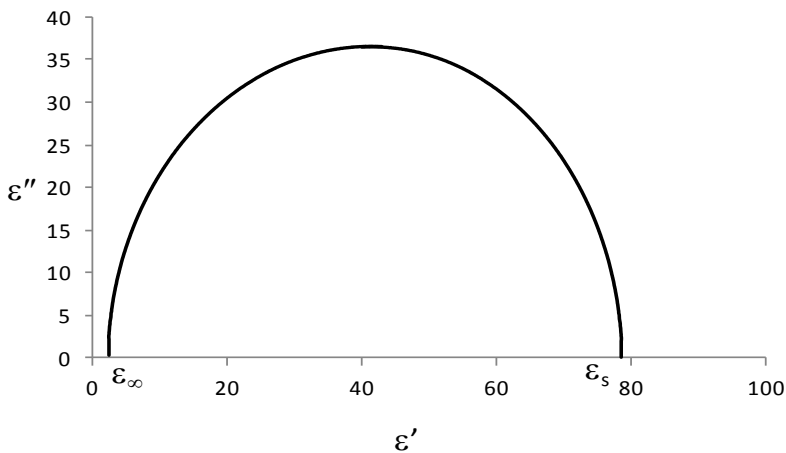


Figura 1.2.6 Representación del diagrama Cole & Cole (Cole y Cole, 1941).

Si por el contrario el sistema presenta conductividad iónica, al representar un gráfico Cole & Cole las dispersiones β y α se verán enmascaradas por la conductividad, y sólo se podrá representar la dispersión γ . La representación quedará como se muestra en la figura 1.2.7.

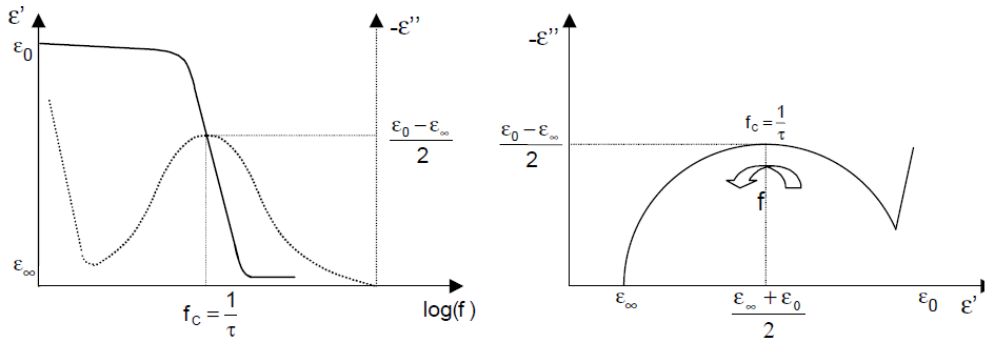


Figura 1.2.7 Representación del modelo de Debye y el diagrama Cole & Cole para sistemas electrolíticos (Shubert y Regier, 2005).

Es posible aplicar el modelo de Debye para todas las dispersiones de radiofrecuencia y microondas mediante la siguiente ecuación (Shubert y Regier, 2005):

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon'' = \epsilon_\infty - \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega} + \frac{\Delta\epsilon_\alpha}{1+j\omega\tau_\alpha} + \frac{\Delta\epsilon_\beta}{1+j\omega\tau_\beta} + \frac{\Delta\epsilon_\gamma}{1+j\omega\tau_\gamma}$$

(Ecuación 1.10)

1.3 Niveles estructurales de los alimentos

La materia presenta diferentes niveles estructurales en su organización. Dichos niveles se pueden clasificar en función de su nivel de complejidad. Desde los sistemas más simples, puros y homogéneos como son los cristales hasta los más complejos como son los sistemas celulares, que gracias a su complejidad permiten la vida en el universo.

Como sistema más simple, en cuanto a su organización estructural, se encuentran los sistemas cristalinos. Estos sistemas forman una única fase, homogénea, isótropa y bastante estable.

Un ejemplo de un sistema cristalino puede ser un cristal electrolítico como el cloruro sódico, que presenta una fase homogénea, única y continua, con una actividad de agua crítica a la que se forma de 0,755 a 25°C.

Un segundo nivel estructural son las disoluciones, una disolución es una mezcla homogénea de dos o más sustancias en el mismo estado (fluido), con un componente que actúa como disolvente y uno o varios componentes que actúan como solutos. Este nivel se divide en dos subgrupos, en el primero están las disoluciones electrolíticas, cuyos solutos son sales, con propiedades físicas críticas que definen su estado. Un ejemplo alimentario es la salmuera o disolución de cloruro sódico. El segundo lugar están las disoluciones no electrolíticas, cuyos solutos más comunes en alimentos son los azúcares. Dichos solutos presentan una gran capacidad de deformación presentando la capacidad de sobresaturarse muy por encima de sus propiedades físicas de cambio de estado.

El tercer nivel de complejidad, corresponde a los sistemas coloidales. Los sistemas coloidales presentan al menos dos fases inmiscibles en las que se reparten todos los componentes del sistema. Una de las dos fases mantiene la continuidad del sistema, denominándose fase continua, el resto de fases se encuentran repartidas por la fase continua y se denominan fases dispersas. Estos sistemas se pueden dividir a su vez en dos subsistemas, los sistemas coloidales que presentan inmiscibilidad

por estar cada fase en un estado de agregación distinto, un ejemplo alimentario es el pan, con una fase sólida (la miga y la corteza) y una fase gas. El segundo subsistema es el que presenta una inmiscibilidad entre las fases por insolubilidad, un ejemplo alimentario son la mayonesa o la leche.

El último nivel de organización estructural es el sistema celular. Este nivel estructural presenta el mayor nivel de complejidad, caracterizándose por estar compuesto por distintas fases, que mantienen su separación mediante membranas y paredes, con una elevada capacidad de organización y con interacciones pasivas y activas que mantienen el sistema lejos del equilibrio. Estos sistemas pueden dividirse en tres subniveles: el primero en orden evolutivo es el de los microorganismos, el segundo son las células animales y, por último, las células vegetales. Estos dos últimos tienen la capacidad de asociarse y adquirir propiedades de grupo.

1.3.1 Estructura y microestructura de sistemas coloidales

Los sistemas coloidales se pueden clasificar en función del estado de agregación de la fase continua y de su inmiscibilidad con la fase dispersa, tal y como se puede observar en la tabla 1.1 (Trados, 2013).

En fases continuas líquidas se puede diferenciar entre, las que tienen la fase dispersa líquida e insoluble, denominada emulsión; normalmente estas fases son grasas o acuosas, un ejemplo

alimentario es la mayonesa o la leche; las de fase dispersa sólida, denominada dispersión o suspensión, un ejemplo son las caseínas en la leche; y las que tienen una fase dispersa gaseosa, denominadas espumas, como por ejemplo la espuma de cerveza.

El coloide con fase continua sólida y con una fase dispersa líquida se denomina gel; como ejemplos alimentarios se puede nombrar el queso o el chocolate. Si la fase dispersa es también sólida, ésta debe de ser insoluble, denominándose suspensión, un ejemplo es el helado. Por último, si la fase dispersa es gaseosa el sistema se denomina espuma sólida y un ejemplo es el pan.

El sistema coloidal denominado aerosol es aquel cuya fase continua es gaseosa y cuya fase dispersa es líquida o sólida, siendo una estructura poco importante en los sistemas alimentarios (Dickinson, 1992).

Tabla 1.1 Clasificación de sistemas coloidales.

Fase continua	Fase dispersa	Estructura coloidal	Ejemplo
Líquido	Líquido	Emulsión	Leche, mayonesa
	Sólido	Dispersión	Pasta de dientes
	Gas	Dispersión Espuma	Cerveza* Espuma de cerveza
Sólido	Líquido	Emulsión sólida Gel	Chocolate Queso*, gel de colágeno*
	Sólido	Suspensión	Helado
	Gas	Espumas sólidas	Miga de pan, merengue
Gas	Líquido	Aerosol	Nieblas, espray
	Sólido	Aerosol	Humos, polvo

*Sistemas coloidales analizados en la presente tesis.

La cerveza es una mezcla compleja de componentes, de los cuales alrededor de 450 han sido caracterizados. La cerveza contiene macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos), además de agua y una fase gas dispersa. Todos estos componentes son fundamentales para caracterizar la calidad de la cerveza. Desde el punto de vista químico, la cerveza es un sistema coloidal multifásico, formado por una fase dispersa de partículas separadas e independientes, unidas en agregados en estado sólido (carbohidratos y proteínas), gas (CO₂) y una fase continua en estado líquido (agua, etanol) (Vanderhaegen, et al., 2007).

La leche es una emulsión con fase continua acuosa y fases dispersas de grasa y caseínas en suspensión. Los glóbulos grasos mantienen interacciones complejas en su superficie ya que se producen fuertes interacciones eléctricas que provocan acumulaciones de moléculas iónicas y de agua que permiten la asociación con lipoproteínas, ver figura 1.3.1 (Aguilera y Stanley, 1999). Por otra parte, las micelas de caseína están constituidas por agua, proteínas y sales. El queso es un gel que conforma una red tridimensional formada por la asociación de aglomerados de caseína que forman un entrelazado polimérico; esta malla atrapa e inmoviliza a la fase líquida acuosa formando una estructura rígida (Aguilera y Stanley 1999).

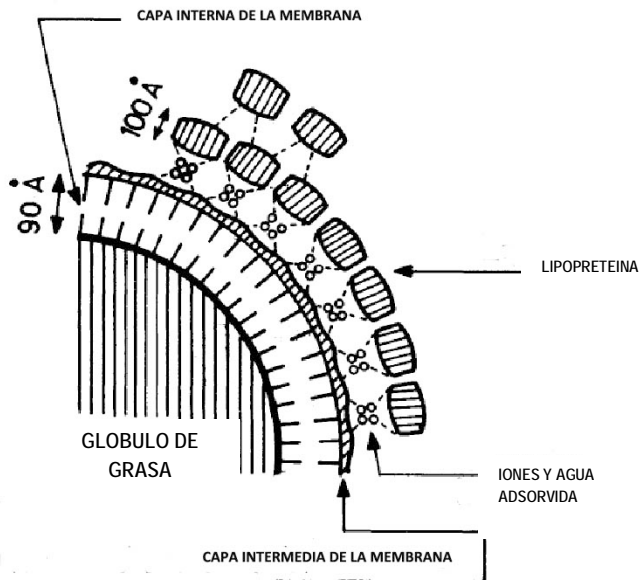


Figura 1.3.1 Modelo morfológico de un glóbulo de grasa (adaptado de Aguilera y Stanley, 1999).

Los geles de colágeno, tienen la capacidad de agrupar agua dentro de estructuras semisólidas. Exhiben un comportamiento viscoelástico y un moderado módulo de deformación. Contienen dos fases, una de ellas es sólida representando a la fase continua del gel; la segunda fase es líquida, la cual queda atrapada en la red tridimensional. Desde el punto de vista termodinámico, el estado gel se puede considerar, como un estado amorfo, entre el sólido y el líquido (Aguilera y Stanley 1999).

1.4 Transiciones de fase

Las transiciones de fase en los alimentos consisten en cambios conformacionales, inducidos por variaciones de las variables de estado de un sistema, que producen un cambio brusco en las

propiedades físicas del mismo. Estos cambios pueden ser de dos tipos, en función de la necesidad o no de variar la energía del sistema para producir la transformación. Una herramienta útil para caracterizar estas transformaciones son los diagramas de fase (Figura 1.4.1). Los cambios en las temperaturas de transición, se utilizan para modelizar diversos procesos industriales, tales como la evaporación, la deshidratación, la congelación, etc., y poder determinar la evolución de las propiedades físicas de los alimentos (Roos, 1995).

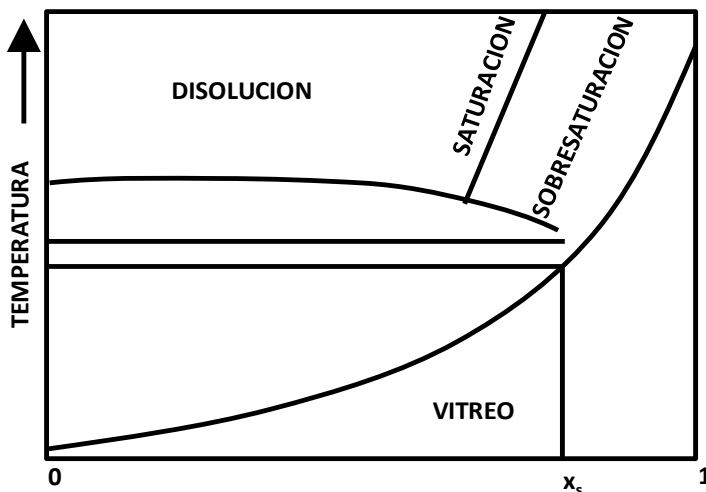


Figura 1.4.1 Representación esquemática del diagrama de estado típico de los estados de fase. Adaptado de Martínez-Navarrete et al. (2000).

Las transiciones de fase se clasifican en transiciones de primer y segundo orden. Una transición de fase de primer orden es aquella en la que ocurre un cambio estructural inducido por la variación de las variables de estado pero con la necesidad asociada de variar la energía del sistema, en estas transiciones se incluyen las transiciones entre los estados fundamentales (sólido, líquido, gas

y plasma). Esto es, la transición de estado sólido a líquido contempla los fenómenos de la fusión y la cristalización, en la transición de líquido a gas incluye los fenómenos de evaporación y condensación, otro fenómeno es la sublimación, que es un cambio de estado sólido a gas (Roos, 1995).

Cuando ocurre una transición de primer orden, hay una discontinuidad en la primera derivada respecto a la presión (P) o la temperatura (T) de la función energía libre (G). Esto es, la derivada se corresponde, respectivamente con la entropía (S) y el volumen (V) del sistema, en este caso el alimento (ecuaciones 1.11 y 1.12):

$$\left(\frac{dG}{dT}\right)_P = -S \quad (\text{Ecuación 1.11})$$

$$\left(\frac{dG}{dP}\right)_T = -V \quad (\text{Ecuación 1.12})$$

Las transiciones de fase de segundo orden, incluyen todos los cambios conformacionales inducidos por variaciones en las variables de estado que no requieren cambios en la energía interna del sistema. Estas transformaciones suelen ser cinéticas, por lo que la naturaleza de la transformación podrá variar en función de la velocidad a la que se produzca la misma. Según la clasificación por Ehrenfest (1933), son aquellas en las que hay una discontinuidad en la transición de la segunda derivada de G o del potencial químico (μ), respecto a T^2 , P^2 o TP (ecuaciones 1.11 y 1.12). En este tipo de transiciones, los valores termodinámicos de

entalpía (H), entropía (S) y volumen (V) de dos fases son iguales a la temperatura de transición. Por lo tanto, la transición de segundo orden no requiere de un calor latente de cambio de fase, pero tiene una discontinuidad en el calor específico (C_P) (Roos, 1995). La segunda derivada de G está relacionada con C_P , la compresibilidad isotérmica (β) y el coeficiente de expansión térmico (α) del sistema (ecuaciones 1.13 a 1.15). Un ejemplo de este tipo de transición en alimentos es el cambio de estado de vítreo a gomoso, denominada como transición vítrea (Martínez-Navarrete et al., 2000).

$$\left(\frac{d^2G}{dT^2}\right)_P = -\frac{C_P}{T} \quad (\text{Ecuación 1.13})$$

$$\left(\frac{d^2G}{dPdT}\right)_{TP} = V\alpha \quad (\text{Ecuación 1.14})$$

$$\left(\frac{d^2G}{dP^2}\right)_T = -V\beta \quad (\text{Ecuación 1.15})$$

1.4.1 Transiciones en sistemas proteicos

Las transiciones de fase que se producen en sistemas proteicos principalmente son: la desnaturalización y la transición vítrea. Kauzmann (1959), define la desnaturalización de la proteína como un proceso o una secuencia de procesos en los que la disposición espacial de la cadena de polipéptidos, dentro de la molécula de proteína, cambia su disposición a una más desordenada, pudiendo ser reversible o irreversible. Esta desnaturalización sucede principalmente cuando existen cambios de temperatura. La

desnaturalización de proteínas es una transición de primer orden (Martínez-Navarrete et al., 2000; Roos, 1995). Foegeding (1988), establece que la temperatura de desnaturalización (T_d), es la temperatura a la cual la concentración de la proteína nativa es igual a la de la proteína desnaturalizada. La mayoría de las proteínas se desnaturalizan a temperaturas entre 50 y 80°C. No obstante, se ha encontrado que el comportamiento de desnaturalización de las proteínas depende del pH, la fuerza iónica, y la velocidad de calentamiento, así como de las condiciones de fabricación (Arntfield et al., 1990). Cada proteína tiene una temperatura específica de desnaturalización, dependiendo de sus componentes y de los otros parámetros mencionados anteriormente (Privalov y Khechinashvili, 1974). Los alimentos son sistemas complejos que en ocasiones pueden presentar varias proteínas al mismo tiempo, un ejemplo es la carne (miosina, proteínas sarcoplásmicas, colágeno y actina). En estos casos, el sistema presenta varias temperaturas de desnaturalización.

La segunda transición de fase que se presenta en los sistemas proteicos es la transición vítrea, esta transición ocurre normalmente en la fase líquida, y tiene una gran influencia en la estabilidad del producto. La transición vítrea de un alimento, en condiciones de baja humedad, ocurre por la sobresaturación de solutos solubles, alcanzando el límite de solubilidad de los solutos y aumentando exponencialmente la viscosidad del medio, lo que le confiere propiedades solido-rígidas o de líquido subenfriado; por

debajo de esta temperatura todo el sistema queda en un estado vítreo (Roos, 1995).

1.5 Termodinámica de los sistemas complejos

Debido a la alta complejidad de las estructuras alimentarias, los nuevos modelos cinéticos desarrollados en el diseño de productos y procesos alimentarios, deben incorporar suficiente información acerca de todos los aspectos físicos, termodinámicos, estructurales, químicos y bioquímicos de los mecanismos involucrados en sus transformaciones (Castro-Giráldez et al., 2010g, 2011b y 2011c).

Los alimentos son mayoritariamente estructuras coloidales o celulares, con una elevada complejidad, debido a su compartimentación en fases que no se encuentran en equilibrio. Dichas fases se componen a su vez de distintas especies químicas que sufren transformaciones físicas desacopladas entre ellas. Una herramienta para determinar la evolución de un sistema compartimentado, no equilibrado, con especies químicas en transformación es la termodinámica irreversible no lineal.

La termodinámica irreversible permite acoplar todos los mecanismos involucrados en las transformaciones únicamente en los potenciales termodinámicos. En el caso de los fenómenos de transporte, el potencial termodinámico es el químico.

Los alimentos son sistemas compartimentados, separados por interfases, en cuyas fases se definen las variables de estado, por

esta razón todas las variables de estado presión (P), temperatura (T), volumen (V), concentración de las especies químicas (n_i), afectan al valor de la energía libre (G), y por consiguiente a los fenómenos de transporte. En este sentido, la propiedad termodinámica que permite cuantificar los cambios asociados a las propiedades de los alimentos, es la variación en la energía libre (ΔG), esta propiedad mide la capacidad del sistema para transformarse. Las reacciones con un valor ΔG negativo tienen lugar de forma espontánea. Las reacciones en las que ΔG es positivo es necesaria una aportación de energía para que se produzca la transformación. De tal manera que la proximidad al equilibrio y los flujos de especies químicas que se producen al transformar un alimento se determina en función de la variación de energía libre de Gibbs (G) (Nicolis y Prigogine, 1977a, b).

Para un sistema multicomponente en el que ocurren cambios en la composición, produciéndose un fenómeno de transferencia de especies químicas entre fases, siendo G únicamente función de T, P y n_i , se obtiene la ecuación simplificada de Gibbs-Duhem (Demirel, 2002).

$$\Delta G = -S\Delta T + V\Delta P + \sum_i \left(\frac{\Delta G}{\Delta n_i} \right)_{P,T,n_j \neq i} \cdot \Delta n_i \quad (\text{Ecuación 1.16})$$

La tendencia de los componentes a dejar una fase se expresa mediante el valor del potencial químico de cada componente presente en cada fase.

Para cada sistema es necesario definir las principales propiedades físicas que afectan al valor de G, puesto que en la mayoría de los sistemas complejos, las variables de estado no son suficientes para definir la energía libre. La variación de G en sistemas coloidales y celulares puede ser estimada mediante la siguiente ecuación (Demirel, 2002; Castro-Giráldez et al., 2010g).

$$\Delta G = -S\Delta T + V\Delta P + F\Delta l + \psi\Delta e + \sum_i \mu_i \Delta n_i \quad (\text{Ecuación 1.17})$$

En algunos casos, el transporte de materia de i ocurre asociado al acoplamiento de fenómenos mecánicos, térmicos y químicos, asociados a las variables de estado y a otras características del medio. A partir de la ecuación de Gibbs-Duhem extendida para cada caso particular (ecuación 1.17), puede calcularse la variación de G (ΔG) en el sistema, asociada a la pérdida (o ganancia) de Δn_i moles de i como, el potencial químico. Para sistemas a presión y temperatura constante, que no presentan interacciones con otras especies químicas se puede expresar como:

$$\mu_i = \left(\frac{G}{n_i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} = RT \ln a_i \quad (\text{Ecuación 1.18})$$

Siendo R la constante de los gases ideales, T la temperatura expresada en K y a_i la actividad de la especie química estudiada.

De la ecuación de Gibbs-Duhem dividida por Δn_i y para $\Delta n_{j \neq i} = 0$ resulta en:

$$\Delta\mu_i = \frac{\Delta G}{\Delta n_i} = \bar{V}_i \Delta P - \bar{S}_i \Delta T + F \Delta l + \psi \Delta e + \mu_i|_{T,P,n_{j \neq i}} + \sum \mu_j|_{T,P,n_{i \neq j}}$$

(Ecuación 1.19)

Onsager (1931) propuso que un flujo mantiene una relación lineal con todas las fuerzas impulsoras representativas en el sistema, esto es, que en los flujos acoplados el flujo i -ésimo no depende sólo de su fuerza impulsoras a través de su coeficiente primario, sino también de las fuerzas restantes de coeficientes secundarios. Siendo estas relaciones válidas para sistemas de no equilibrio termodinámico.

La primera relación de Onsager describe un flujo de una especie química determinada como la relación entre la fuerza impulsora y un coeficiente fenomenológico que describe la relación de la especie química en movimiento con el medio a través del cual se transporta. Si la primera relación de Onsager se aplica sobre la termodinámica irreversible se obtiene la siguiente expresión:

$$J_i = L_i \Delta\mu_i \quad \text{(Ecuación 1.20)}$$

Donde J_i representa el flujo, L_i es el coeficiente fenomenológico y $\Delta\mu_i$ es el potencial químico, el subíndice i hace referencia a la especie química.

1.6 Procesos industriales estudiados

Proceso de elaboración de cerveza

En la figura 1.6.1 se muestra el proceso de fabricación de cerveza. Este proceso de fabricación comprende cuatro fases fundamentales:

- Preparación de la malta: en esta etapa los cereales (cebada principalmente) se someten a un proceso de limpieza, después pasan por un tiempo en remojo y germinación y posteriormente a un proceso de secado y tostado.
- Obtención del mosto: de la malta previamente molida y acondicionada se obtendrá el mosto mediante un proceso de extracción por sacarificación enzimática. A continuación se clasifica por filtración, se le adiciona el lúpulo y se sigue con un proceso de cocción, una vez extraídos los componentes se procede a la etapa más importante en la fabricación de la cerveza.

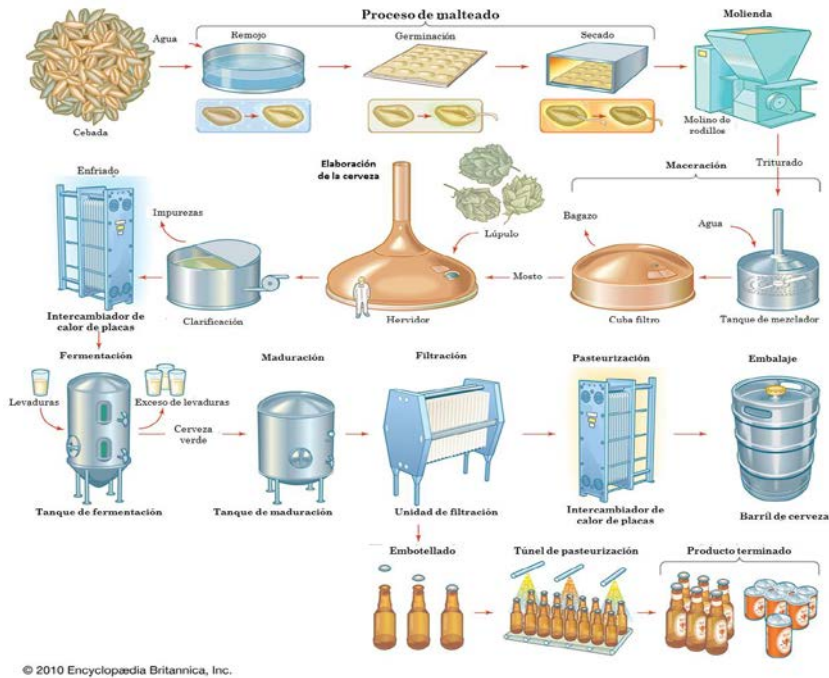


Figura 1.6.1. Proceso de fabricación de cerveza (adaptado de Enciclopedia Británica, Inc. 2010).

- La fermentación es la etapa más importante en la fabricación de la cerveza, esta etapa consiste básicamente de la adición de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*). Durante el proceso de fermentación, las levaduras se multiplican, alimentándose de ciertos azúcares (glucosa, fructosa, maltosa, etc.) que hay en los almidones, y eventualmente los transforman en alcohol.
- Maduración y clarificación: la cerveza obtenida después del proceso de fermentación será sometida a un proceso de maduración en bodegas (contenedores) y, en su caso, a una clarificación (Hough, 1996).

Debido a que la etapa de fermentación es la que se ha estudiado en uno de los capítulos de esta tesis, a continuación se va a explicar más en profundidad.

La fermentación alcohólica constituye el fenómeno microbiológico principal para la obtención de la cerveza y consiste en una serie de etapas bioquímicas por las que el mosto se transforma en cerveza. El mosto contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura, constituido por carbohidratos (50–60% de maltosa, 15–20% de malto-triosa y 10–15% de glucosa), fuentes de nitrógeno (aminoácidos) y una gran cantidad de minerales (Jespersen et al., 1999; Sanchís et al., 2000). A partir de estos componentes, la levadura produce etanol (Sanchís et al., 2000). La temperatura de fermentación depende del tipo de cerveza, para las cervezas tipo lager está entre 7 y 13°C y para las tipo Ale entre 16 y 18°C.

En los métodos tradicionales de fabricación de cerveza, la etapa de fermentación se controla mediante la temperatura del mosto, el tamaño del inóculo de levadura, y en menor medida por el grado de agitación para acelerar la fermentación. Otros métodos permiten además controlar la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto y el contenido de aminoácidos.

Para garantizar la calidad en la cerveza, la industria aplica una variedad de métodos analíticos como la destilación, densitometría, refractometría, cromatografía líquida, análisis enzimáticos y espectrofotometría; estos métodos han sido usados para la

evaluación de importantes parámetros fisicoquímicos, tales como graduación alcohólica, densidad relativa, gravedad original, concentración de ácido láctico, pH, amargor y color (Lachenmeier, 2007). Además de las técnicas analíticas, la caracterización organoléptica por paneles sensoriales y consumidores permanece como la mejor forma de evaluar la cerveza. Desafortunadamente, estos métodos tradicionales son muy caros y usualmente requieren a operadores altamente cualificados (Lachenmeier, 2007).

La tendencia actual en el análisis de alimentos está enfocada a técnicas rápidas, simples y fiables, con el potencial para remplazar parcialmente o por completo los complejos y caros métodos de referencia.

Proceso de elaboración de queso

La elaboración de queso es un proceso complejo de varias etapas, en el que intervienen diversas transformaciones bioquímicas. Existen numerosas variables de proceso que afectan a la composición, calidad, rendimiento, etc. Por tanto, el proceso de fabricación de un queso resulta extremadamente complejo, resultando fundamental comprender perfectamente las distintas transformaciones físicas, químicas y bioquímicas para poder mejorar la calidad del queso (Walstra, 2001).

Las etapas fundamentales en la elaboración de queso se muestran en la figura 1.6.2. Aunque puede haber etapas diferentes para

cada tipo de queso, hay algunas que son esenciales para su fabricación; en primer lugar está la coagulación de la leche, seguida por la formación de la cuajada ocasionada por la actividad enzimática del cuajo, después la separación de lactosuero debido al corte de la cuajada. Una vez terminada la etapa anterior, la cuajada se coloca en moldes para dar forma al queso mediante la aplicación de presión a los moldes. El objetivo de prensar es ayudar a la expulsión del suero, conseguir una textura adecuada y proporcionar una corteza al queso. Después del prensado se realizan las operaciones de salado (que describiremos más adelante) y por último se almacena el queso para su curado.



Figura 1.6.2 Proceso de fabricación de queso.

Etapa de salado:

La sal juega un papel importante en la fabricación de quesos. Aporta un sabor característico, mejora la etapa de desuerado

favoreciendo el drenaje de la fase acuosa del gel, modifica la hidratación de las proteínas e interviene en la formación de la corteza. También actúa sobre el desarrollo y crecimiento de microorganismos y la actividad enzimática, para potenciar, controlar o inhibir dichos procesos durante la fabricación de queso.

La incorporación de sal al queso se efectúa de diferentes formas: salado en seco, en el que la sal se mezcla con los trozos de cuajada por frotamiento de la superficie del queso, o salado en salmuera, el queso se sumerge en una disolución saturada de NaCl hasta que absorbe la cantidad de sal deseada (Walstra et al., 2001).

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis consiste en aplicar la espectroscopia dieléctrica en sistemas alimentarios complejos, desarrollando herramientas que permitan monitorizar la fabricación de dichos alimentos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Con el fin de cumplir con el objetivo general de la tesis se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- 1 Revisar las distintas aplicaciones de la espectroscopia dieléctrica en alimentos.
- 2 Determinar los espectros dieléctricos de cerveza tipo lager durante su fabricación, desarrollando algoritmos que permitan monitorizar el proceso de fermentación.
- 3 Desarrollar un modelo termodinámico irreversible no lineal que permita describir y cuantificar las transformaciones estructurales que sufre el queso durante el proceso de salado.
- 4 Analizar la operación de salado de queso mediante espectroscopia dieléctrica. Análisis de las propiedades dieléctricas identificando las frecuencias que caracterizan el proceso.

5 Analizar los espectros dieléctricos en el rango de radiofrecuencia y de microondas, en geles de colágeno, identificando la relación de las propiedades dieléctricas con la conformación microestructural de un sistema coloidal.

2.3 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo de la presente tesis se subdividió en planes experimentales, correspondientes con los objetivos particulares expuestos en el apartado anterior.

1 La utilización de sensores basados en la espectroscopia dieléctrica como una buena herramienta para asegurar la calidad y seguridad alimentaria

Este estudio se corresponde con el objetivo particular 1 y su plan experimental es el que a continuación se presenta:

Para desarrollar este objetivo, a continuación se expone el plan de trabajo propuesto para alcanzarlo. En primer lugar, se plantearon los temas que debería contener la revisión, a través de las investigaciones realizadas hasta el momento sobre el tema de espectroscopia dieléctrica. Posteriormente y tras la recopilación sistemática de la información publicada relacionada con el tema se organizó en tres temas principales una descripción general de la espectroscopia dieléctrica y dos aplicaciones a sistemas

alimentarios con diferente conformación microestructural. Las etapas principales de esta revisión fueron:

- Definición correcta del tema
- Elaboración del plan de trabajo
- Recopilación bibliográfica
- Selección de los documentos
- Análisis de los documentos
- Síntesis de la información
- Redacción del artículo de revisión

2 Análisis de los espectros dieléctricos en la fabricación de cerveza tipo lager

Este estudio se corresponde con el objetivo particular 2 y su plan experimental es el que a continuación se presenta:

- Puesta a punto del método específico de medida de propiedades dieléctricas para muestras de cerveza mediante la sonda coaxial Agilent 85070E y el analizador de redes Agilent E8362B.
- Formulación de disoluciones modelo variando los componentes mayoritarios en la cerveza.
- Medida y análisis físico-químicos de las disoluciones patrón.
- Medida y análisis de las propiedades dieléctricas de disoluciones modelo de componentes mayoritarios en la bioquímica de fermentación de la cerveza, mediante la utilización de la sonda coaxial Agilent 85070E y el

analizador de redes Agilent E8362B. Identificación de las frecuencias clave para la determinación de los componentes más relevantes de la cerveza.

- Medida y análisis de los parámetros bioquímicos y físico-químicos de muestras de cerveza durante la fermentación.
- Estudio de la relación entre los parámetros bioquímicos y físico-químicos con las determinaciones dieléctricas realizadas a las muestras.

3. Investigación de los cambios microestructurales del queso durante el salado, análisis termodinámico no reversible y su relación de la técnica de espectroscopia dieléctrica con el proceso de salado

Este estudio se corresponde con los objetivos particulares 3 y 4, el plan experimental se presenta a continuación:

- Salado de muestras de queso fresco en salmuera al 25% de cloruro sódico muestreando a distintos tiempos. Análisis de las muestras tratadas y reposadas.
- Análisis de las cinéticas de cambio fisicoquímico y estructural de las muestras tratadas y reposadas, determinando los puntos críticos en la transformación del producto lácteo.
- Deshidratación osmótica de queso fresco en disolución de agua y sal (salmuera). Análisis de las muestras tratadas y reposadas.

- Análisis de las cinéticas de cambio fisicoquímico y estructural de las muestras tratadas y reposadas, determinando los puntos críticos en la deshidratación osmótica.
- Medida y análisis de los espectros dieléctricos mediante la utilización de la sonda coaxial Agilent 85070E y el analizador de redes Agilent E8362B de muestras de queso fresco tratadas y reposadas.
- Desarrollo de algoritmos de control que permitan controlar los parámetros de salado calidad en queso durante la operación de salado.

4. Estudio de la influencia de la composición y estructura de geles de colágeno mediante la utilización de espectros dieléctricos

Este estudio se corresponde con el objetivo particular 5 y su plan experimental es el que a continuación se presenta:

- Preparación de geles cuya composición sea a distintas concentraciones.
- Medida de los espectros dieléctricos de los geles preparados mediante la sonda coaxial Agilent 85070E y el analizador de redes Agilent E8362B. Identificación de las frecuencias clave para la determinación de las interacciones de los componentes mayoritarios en geles.
- Estudio de la relación entre los parámetros físico-químicos y los espectros dieléctricos.

- Puesta a punto de los métodos específicos de medida de propiedades dieléctricas para muestras de geles mediante los platos paralelos Agilent 16451B y el analizador de impedancias Agilent 4294A.
- Puesta a punto del método de medida de propiedades dieléctricas para muestras de geles mediante un prototipo de sensor de puntas retractiles y el analizador de impedancias Agilent 4294A.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

➤ Cerveza

Para el estudio de la fermentación en cerveza se utilizó como materia prima una mezcla comercial de maltas procesadas (Brewmaker Original Lager kit, Mr. Malt®, Italy), cuyos ingredientes eran: extracto de malta (de cebada) y lúpulo. Además se usó; sacarosa, agua destilada y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

➤ Queso

Para los estudios realizados en salado se empleó como materia prima queso fresco tradicional de la Comunidad Valenciana. Las muestras fueron proporcionadas por Granja Rinya S.L. Los quesos se recogían el día de su fabricación y moldeado en la fábrica. Estos quesos eran transportados en un contenedor atemperado hasta el laboratorio y se mantenían en refrigeración a 6°C, hasta el momento de su utilización en el experimento. Se utilizó NaCl de calidad aditio para análisis (Panreac, Barcelona), en la preparación de la salmuera se usó agua destilada.

➤ Geles

Para los estudios realizados con geles, se usó colágeno al 95% de pureza (Tradissimo®), almacenados en una cámara a 25°C hasta el momento de su utilización en los distintos experimentos. Para preparar las formulaciones se usó agua destilada.

➤ **Elaboración de disoluciones patrón**

En la preparación de disoluciones modelo se formularon disoluciones a distintas concentraciones de los componentes mayoritarios en cerveza, todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich, Alemania y Panreac, Barcelona) y agua des-ionizada milli®-Q (Millipore Elix, Francia).

3.2 Medida de las propiedades dieléctricas

Para las mediciones de las propiedades dieléctricas en los sistemas alimentarios se utilizaron dos equipos para cada tramo de frecuencias utilizado (ver figuras 3.2.1, a 3.2.4).

Los espectros dieléctricos para el rango de las microondas se midieron con una sonda coaxial Agilent 85070E, conectada a un analizador de redes Agilent E8362B, ubicada en el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IuIAD). Este analizador de redes mide en un rango de frecuencias que va desde los 10 MHz a 20 GHz, en uno de sus dos puertos se une un cable flexible; modelo 85131F que lleva acoplada una transición de dieléctrico de teflón para unir el cable coaxial modelo 85070-60006, que se conecta a la sonda dieléctrica 85070E (Figura 3.2.1).

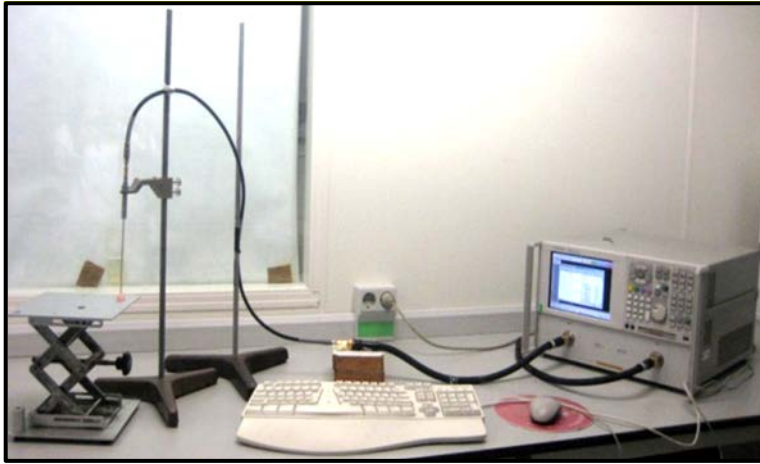


Figura 3.2.1 Sonda coaxial Agilent 85070E y analizador de redes Agilent E8362B.

La sonda coaxial (slim form probe Agilent 85070E), puede medir en el rango de frecuencias que van desde los 500 MHz a 50 GHz. Esta sonda tiene un diámetro externo de 2.2 mm y una longitud de 200 mm (figura 3.2.2). La sonda puede operar a temperaturas en un rango de 0 a 125°C. Esta sonda se utiliza para medir soluciones y semisólidos principalmente.

Por otra parte, para evitar vibraciones durante las medidas, se utilizó un elevador mecánico de acero inoxidable para acercar la muestra a la sonda, reduciendo los errores debido al movimiento de los cables durante la realización de las medidas.

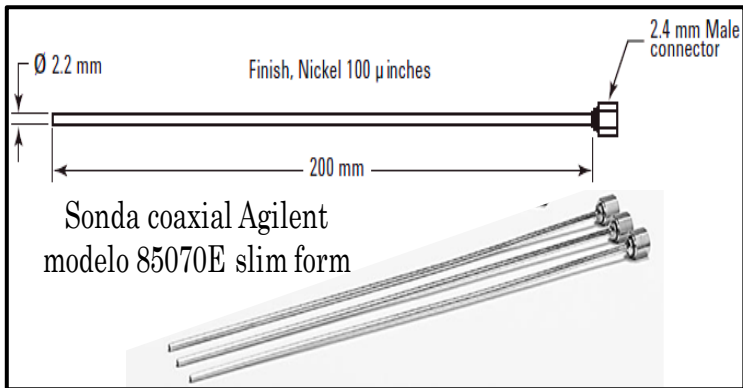


Figura 3.2.2 Esquema de la sonda Slim Form Probe Agilent E85070 (Agilent Technologies, 2005).

Antes de efectuar las medidas fue necesario realizar una medida de calibración de la sonda para eliminar errores. La sonda se calibra midiendo primero el aire, seguidamente se acopla un accesorio formado por un polímero conductor en la parte final de la sonda que provoca un cortocircuito (ver figura 3.2.3), y finalmente se procede a la calibración con agua Milli®-Q a 25°C.

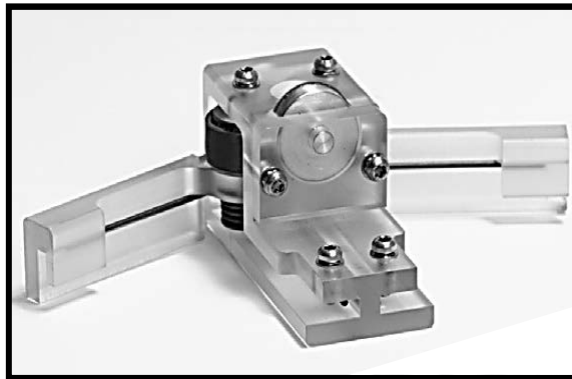


Figura 3.2.3 kit de calibración de la sonda coaxial (Agilent Technologies, 2005).

Para medir los espectros dieléctricos en el rango de radiofrecuencias, se usó un analizador de impedancias Agilent 4294A, y el dispositivo de prueba HP 16451 B (Figura 3.2.4) y el

electrodo B (Figura 3.2.6). Este conjunto está ubicado en el IuIAD. El rango de frecuencias de medida va desde los 40 Hz a 110 MHz.



Figura 3.2.4 Analizador de impedancias Agilent 4294A y platos paralelos Agilent 16451B.

El método utilizado para las medidas de radiofrecuencia fue el de contacto de electrodos (placas) de metal rígido con la muestra, tal y como se muestra en la figura 3.2.5. Este método utiliza dos electrodos rígidos en contacto directo con la superficie de la muestra, para ello las muestras deberán tener una altura menor a 10mm y un diámetro entre 10mm y 56mm. Lo más importante en este método es que no existan espacios entre los electrodos y la superficie del material.

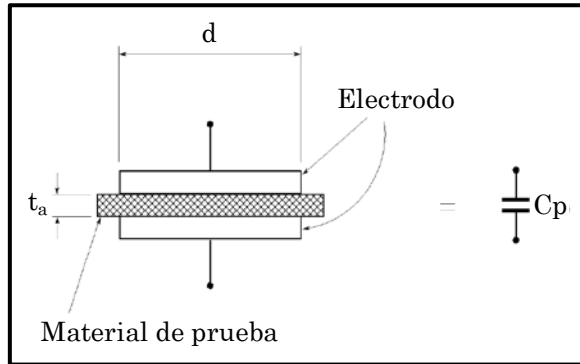


Figura 3.2.5 Método de contacto directo de la muestra con los dos electrodos (placas) de metal (Agilent Technologies, 2000).

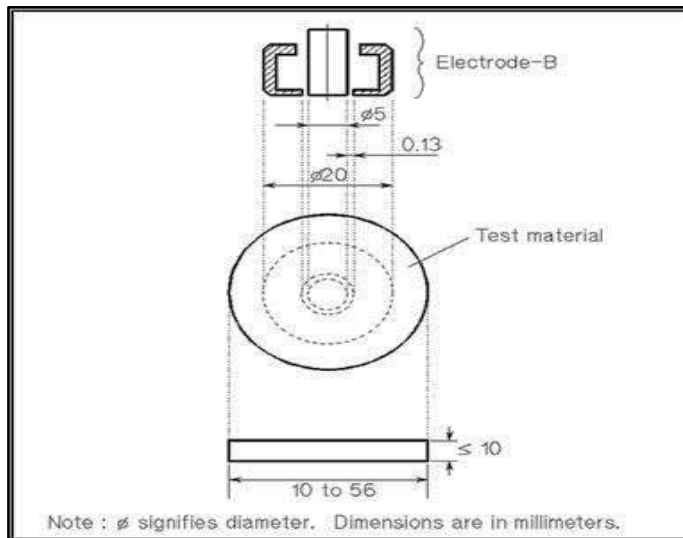


Figura 3.2.6 Detalle del electrodo B (Agilent Technologies, 2000).

La calibración de este equipo consiste en asegurar el paralelismo entre las placas en primer lugar, y después se utiliza el kit open/short proporcionado con el equipo que reduce los errores de medición.

Los valores de la constante dieléctrica, se obtienen a partir de la capacitancia y el factor de disipación como se demuestra en las siguientes ecuaciones (Agilent Technologies, 2000):

$$\varepsilon' = \frac{t_a \times C_p}{\pi \times \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times \varepsilon_0} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$D_t = D = \tan \delta \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Dónde:

ε' : Constante dieléctrica

C_p : Capacitancia equivalente en paralelo (F)

D: Factor de disipación

D_t : Factor de disipación de la muestra

$\tan \delta$: tangente de pérdidas

t_a : Espesor medio de la muestra (m)

d: Diámetro del electrodo superior (m) [$38 \cdot 10^{-3} \text{m}$]

$\varepsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12} \text{ (F} \cdot \text{m}^{-1}\text{)}$

3.3 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

➤ Determinación de masa

Las medidas de masa se realizaron empleando una balanza analítica de precisión de la marca Mettler Toledo®, modelo AB304-S con una precisión de 0,1 mg.

➤ Determinación de volumen

Para realizar las medidas de volumen se decidió emplear una técnica no destructiva, esto es, se realizó con la técnica de análisis de imagen, tanto en alzado como de perfil en las muestras (figura 3.3.1) empleando el software Adobe Photoshop CS5 Extended Versión 12.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, E.E.U.U.).

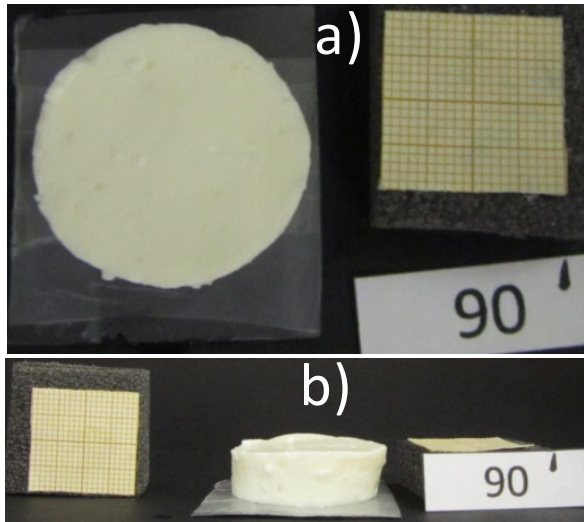


Figura 3.3.1 Detalle del montaje utilizado para la obtención de la superficie **a)** y espesor **b)** de las muestras de queso.

➤ **Determinación de la actividad de agua**

La actividad de agua (a_w) se determinó con un higrómetro de punto de rocío (figura 3.3.2), Decagón de la marca Aqualab®, modelo serie 3 TE a 25°C (Decagon Devices, Inc., Washington, E.E.U.U.). La precisión del equipo es de ± 0.003 . Para comprobar la correcta calibración del equipo se emplearon disoluciones de referencia proporcionadas por la casa Aqualab®. Se considera que los valores de la actividad de agua obtenida, corresponden con la actividad de agua superficial, debido a que las medidas se realizaron sin la desestructuración de las muestras.



Figura 3.3.2 Equipo para medir la actividad de agua (a_w).

➤ **Determinación de la Humedad**

Para las muestras de queso, la humedad se obtuvo por el método AOAC 926.08–1997 modificado. Método gravimétrico de obtención de humedad en estufa a 80°C durante 4h.

$$X_w = \frac{M_{mh} - M_{ms}}{M_{mh} - M} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Dónde:

x_w = fracción másica de agua.

M = masa del recipiente de vidrio (g)

M_{mh} = masa del recipiente de vidrio y la muestra húmeda (g)

M_{ms} = masa del recipiente de vidrio y la muestra seca (g)

Los subíndices: mh, hace referencia a la muestra húmeda y ms, se refiere a la muestra seca.

Para la determinación de la humedad en muestras de geles se empleó el método AOAC 935.46 (1997). Este método consiste en el

secado de la muestra hasta peso constante en estufa a vacío, a 98-100°C. La fracción másica de agua (x_w) se obtuvo a partir de la ecuación 3.3, tanto para queso como para los geles.

➤ **Determinación del contenido de sólidos solubles**

El contenido en sólidos solubles se determinó a partir del índice de refracción de las muestras. La obtención del índice de refracción se realizó con un refractómetro (ABBE, ATAGO, Modelo 3-T, Japón) termostato a 20°C (Figura 3.3.3). A partir de la lectura de °Brix es posible obtener la fracción másica en solutos de la muestra analizada aplicando la ecuación 3.4.

$$X_s = \frac{x_w * z_s}{1 - z_s} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Dónde:

x_s : fracción másica de solutos.

x_w : fracción másica de agua.

z_s : fracción de sólidos solubles en fase líquida.



Figura 3.3.3 Refractómetro ABBE ATAGO, 3-T.

➤ **Determinación de densidad**

Para la determinación de densidad en cerveza, se utilizó Un densitómetro industrial al inicio de la fermentación, con este valor se determinó de la cantidad de alcohol (OIV, 2004). La cuantificación de etanol se estimó por medio de medidas de transmitancia, previamente se calibro con disoluciones patrón agua etanol (Labianca, 1996), con el fin de obtener un mejor control en la cantidad de etanol.

➤ **Determinación de transmitancia**

La transmitancia de las muestras fue medida usando un espectrofotómetro UV/visible a una longitud de 600nm (Helios Zeta v8.00 serie N° 164405).

3.4 Microscopia electrónica de barrido a bajas temperaturas

Para el análisis de la microestructura en muestras de queso, se realizó por medio de la técnica de cryo-sem que se describe a continuación: las muestras se sumergen en nitrógeno líquido (N₂) a temperatura de -210°C y se traslada rápidamente a un Cryostage CT1-500C (Oxford Instruments Witney, UK), acoplado a un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410 (Jeol, Tokyo, Japón), que trabaja en condiciones de congelación ($\leq -130^{\circ}\text{C}$) a vacío (1kPa). En el Cryostage se fractura la muestra a una temperatura de $\leq -180^{\circ}\text{C}$; se toma la muestra y se introduce en la cámara del microscopio para ser sublimada a -95°C , y eliminar el posible exceso de hielo superficial que puede causar ruido en la observación de la muestra. Finalmente, antes de proceder al análisis de la muestra se recubre con oro (Au) a vacío (0,2 kPa) por 3 minutos en el mismo Cryostage, aplicando una corriente ionizante de 2mA. Finalmente la muestra se somete a observación a 15kV y con una distancia de trabajo de 15 mm y una temperatura de $\leq -130^{\circ}\text{C}$, con estas condiciones se capturan las imágenes para su posterior análisis.

3.5 Estudio de las medida de los espectros dieléctricos en cerveza

➤ Disoluciones modelo

Para el estudio de la influencia de la composición sobre las propiedades dieléctricas, se prepararon disoluciones modelo, simulando la composición de los elementos mayoritarios del mosto inicial y de la cerveza tipo lager. La composición se basó con datos bibliográficos (Preedy, 2009).para ello se prepararon diferentes disoluciones modelo a base de estos ingredientes mezclados en proporción variable (tabla 3-1 y tabla 3-2).se utilizó glucosa, fructosa, maltosa y etanol de calidad grado analítico (Panreac, Barcelona). En la preparación de las disoluciones de los sólidos se diluyeron en agua bi-distilada, posteriormente se agito durante 15min asegurando la total dispersión del soluto.

Las disoluciones preparadas se analizaron en cuanto a sus espectros, °Brix, transmitancia y a_w .

Tabla 3.1 Composición de las disoluciones modelo de agua y azúcares.

PATRONES AZÚCAR-AGUA (mg/100mL agua)			
z_s (°Brix)	Glucosa	Fructosa	Maltosa
5	0.8	1.1	3.1
10	1.6	2.2	6.2
15	2.4	3.2	9.3

Tabla 3.2 Composición de las disoluciones modelo de agua, etanol y azúcares.

Patrones etanol–azúcar–agua				
Etanol (mL)	Glucosa (g)	Fructosa (g)	Maltosa (g)	Agua (g)
2	0.8	1.1	3.1	9.5
4	0.8	1.1	3.1	9.5
6	0.8	1.1	3.1	9.5
8	0.8	1.1	3.1	9.5
2	1.6	2.2	6.2	9.0
4	1.6	2.2	6.2	9.0
6	1.6	2.2	6.2	9.0
8	1.6	2.2	6.2	9.0
2	2.4	3.2	9.3	8.5
4	2.4	3.2	9.3	8.5
6	2.4	3.2	9.3	8.5
8	2.4	3.2	9.3	8.5

➤ **Estudio de muestras de cerveza**

La metodología experimental se realizó tal y como se muestra en el diagrama de flujo (Figura 3.5.1), en un primer paso se prepararon disoluciones modelo variando los componentes principales mayoritarios del mosto inicial y de la cerveza tipo lager, y se midieron los espectros dieléctricos. Posteriormente se procedió a la fabricación de cerveza tipo lager para este paso, se preparó de la siguiente forma: se utilizó un montaje formado por un recipiente de 2 L de capacidad y con un dispositivo de respiración, se vertieron 1,5 L de agua destilada y se le añadieron 115g de jarabe de malta, 0.35g de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Brewmaker Original Lager kit, Mr. Malt®, Italy), y 60g de sacarosa. El recipiente se mantuvo a una temperatura de 22°C, en una cámara con control de temperatura.

Para obtener muestras de cerveza durante la fermentación, se realizaron estudios previos estableciendo las condiciones de trabajo, para seleccionar los tiempos de medida durante el proceso. Se tomaron alícuotas en recipientes limpios, a los tiempos de (12, 24, 36, 54, 60, 72, 75, 78, 84 y 96 horas), las muestras se atemperaron a 25°C para realizar las medidas de actividad de agua (a_w), espectros dieléctricos, índice de refractometría, espectrofotometría y cromatografía.

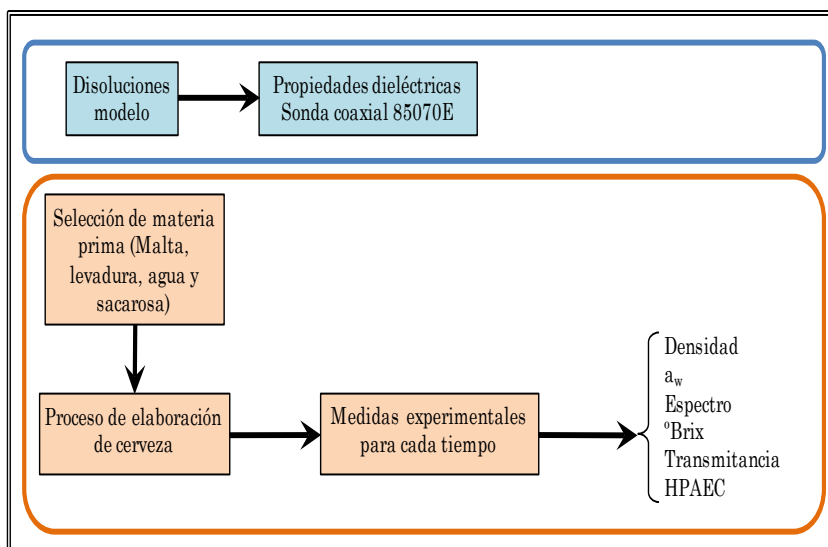


Figura 3.5.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de cerveza.

Para la medida de a_w se usó un higrómetro de punto de rocío Aqualab® series 3 TE (Decagon Devices, Inc., Washington, 105 USA) fue usado para las mediciones de actividad de agua a 25°C. Después se utilizó un densitómetro industrial al inicio de la fermentación para la determinación de la cantidad de alcohol (OIV, 2004), y la cuantificación de etanol posterior se estimó por medio de medidas de transmitancia, previa calibración con

disoluciones patrón agua-etanol (Labianca, 1996), para obtener un mejor control en la cantidad de etanol.

Para cuantificar la transmitancia de las muestras, se utilizó un espectrofotómetro UV/visible, a una longitud de 600nm (Helios Zeta v8.00 serie N° 164405). El índice de refractometría se determinó por medio de un refractómetro (figura 3.3.3, ABBE, ATAGO Model 3- T, Japan).

➤ **Cuantificación de azúcares por cromatografía**

Para cuantificar los azúcares presentes en el proceso de fermentación, se tomó una alícuota de 10 mL y se pasó a un tubo de centrifuga (JP Selecta SA, Medifriger-BL, Barcelona, España) y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Una vez centrifugada la muestra, se tomó 1 ml de sobrenadante y se diluyó con agua Milli-Q® en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Posteriormente la dilución se filtró a través de un filtro Millipore 0.45 µm y de este extracto se tomó 15 ml en tubos para analizar el contenido de azúcares.

El equipo de medida y las condiciones para el análisis de los azúcares fueron: cromatografía líquida de intercambio iónico (HPAEC, por sus siglas en inglés), (Ion Metrohm Ltd., Suiza) utilizando una columna (Metrosep Carb 1: 250x4, 6mm) y una precolumna (Metrosep Carb Guard 5x4.0mm). La fase móvil fue una solución 0,1M de NaOH, con un flujo de 1mL/min; el volumen de inyección de muestra fue de 20µL.

De cada muestra, se prepararon tres extractos y los valores se corrigieron con la ecuación obtenida por las concentraciones de cada uno de los azúcares mayoritarios presentes, a través de las curvas de calibración obtenidas previamente con los diferentes azúcares.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico, usando el software Statgraphic ® Plus, versión 5.1 (StatPoint Technologies, Inc, EE.UU.).

3.6 Estudio de la cinética de salado de queso mediante la utilización de espectros dieléctricos

Para el estudio de la influencia del salado en queso sobre las propiedades dieléctricas, se desarrolló una metodología que se muestra en la figura 3.6.1, a modo de esquema el procedimiento seguido.

Experiencias previas fueron realizadas para la selección de las condiciones a emplear durante la operación de salado, con el objetivo de seleccionar la geometría de la muestra que proporcionara una cinética relativamente rápida, permitiendo el menor tiempo de procesado posible. Al mismo tiempo se utilizaron estas experiencias para fijar otros parámetros como la temperatura, a_w y humedad a alcanzar y tiempos de medidas. Las condiciones generales para esta operación de salado en salmuera son: se utilizó una solución de agua destilada y sal al 25% (p/p) de cloruro de sodio (NaCl; PRS-codex, Panreac® Química SA,

Barcelona, España). La relación entre las muestras y la disolución durante la deshidratación osmótica fue de 1:20 (p/p) para evitar cambios significativos en la concentración de la disolución durante el proceso. El tratamiento se realizó a una temperatura constante de 4°C.

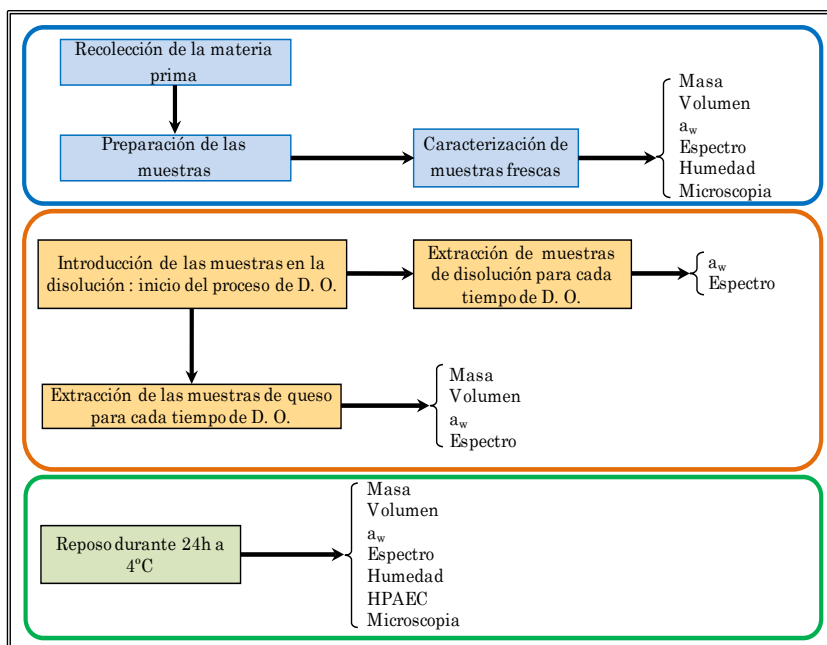


Figura 3.6.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de salado de queso.

Las muestras de queso una vez seleccionado visualmente por presentar homogeneidad aparente, fueron cortadas en cilindros (48) de 30 mm de diámetro y 10 mm de espesor. A continuación fueron identificadas, pesadas e introducidas en las cestas del recipiente que contenía la disolución (salmuera). El agente osmótico empleado fue una disolución de sal al 25% en peso, preparada con agua destilada y NaCl agitando la mezcla

continuamente y durante el experimento. Se prepararon aproximadamente 4 litros manteniéndose el volumen y la temperatura de 4°C.

Las cestas en las que fueron colocadas las muestras de queso, previamente preparadas e identificadas, se introdujeron en el recipiente donde la temperatura permaneció a 4°C y se mantuvo a con agitación continua, gracias al dispositivo que fue acoplado, ver figura 3.6.2. Después de los tiempos prefijados 0, 10, 20, 30, 40, 50 minutos y 1, 1.5, 3, 4, 5, 8, 12, 15 y 24 horas, se extrajeron las muestras correspondientes.

Una vez extraídas las muestras del recipiente se les eliminó el exceso de disolución superficial con papel absorbente y fueron pesadas nuevamente, registrando la variación de peso de cada muestra a cada tiempo. Posteriormente fueron colocadas en recipientes de plástico con tapa cerradas con parafilm® y se atemperaron en una cámara Hotcold-M (JP Selecta®) a 4°C, para realizar las medidas que se describen a continuación.

Durante el tratamiento y tras el reposo se realizaron las medidas de; a_w para esta determinación se utilizó el aparato y metodología descrita en el apartado 3.3, y también para el volumen. En cuanto a las medidas de los espectros dieléctricos se procedió conforme a lo descrito en el apartado 3.2 que se expuso anteriormente.



Figura 3.6.2 Detalle de la operación de la cinética de salado en cámara refrigerada a 4°C.

Tras el tratamiento y una vez realizado las medidas establecidas. Las muestras se equilibraron en una cámara Hotcold-M (JP Selecta®) a 4°C durante 24 horas, para determinar nuevamente las medidas establecidas (a_w , espectros, masa y volumen).

La cuantificación de aniones (Cl^-) y cationes (Ca^{+2} , Na^+) en las muestras se determinó por cromatografía de intercambio iónico (Methrom Ion Analysis, Herisau, Switzerland), usando una columna universal estándar (Metrosep C2–150, 4.0 x 150 mm) con un eluyente compuesto de ácido tartárico (4.0 mmol/L) y ácido dipicolínico (0.75 mmol/L), equipado con detector electrónico. Previo al análisis, las muestras fueron homogenizados a 4200 rpm en un ultraturrax T25 por 5 min y posteriormente centrifugadas a 8000 rpm durante 20 min a 5°C (J.P. Selecta S.A., Medifriger-BL, Barcelona, Spain). Una vez realizado la centrifugación, se tomó 1 mL del sobrenadante y se diluyó con agua bi-destilada (Milli®-Q)

en un matraz aforado de 250 mL. Inmediatamente después se pasó por un filtro millipore de 0.45 μm ; una vez hecho este paso se tomaron 15 mL para las medidas de cromatografía. De cada muestra, se prepararon tres extractos y los valores se corrigieron con la ecuación obtenida por las concentraciones de cada uno de los azúcares mayoritarios presentes, a través de las curvas de calibración obtenidas previamente con los diferentes elementos (Cl^- , Ca^{+2} , Na^+).

Para el estudio de las propiedades micro-estructurales se procedió según lo descrito en el apartado anterior 3.4. En cuanto a la determinación de humedad se utilizó el método de AOAC 926.08–1997 modificado. Método gravimétrico de obtención de humedad en estufa a 80°C durante 4h.

Todas las medidas mencionadas se realizaron por triplicado.

3.7 Estudio de los espectros dieléctricos de geles de colágeno

Para el estudio y análisis de las propiedades dieléctricas en geles de gelatina, se desarrolló una metodología que se muestra en la figura 3.7.1 a modo de esquema el procedimiento seguido.

Experiencias previas fueron realizadas para la selección de las condiciones a emplear durante la operación de gelificación, con el objetivo de seleccionar las concentraciones (tabla 3-3), tiempos y temperatura que permita el menor tiempo de fabricación posible.

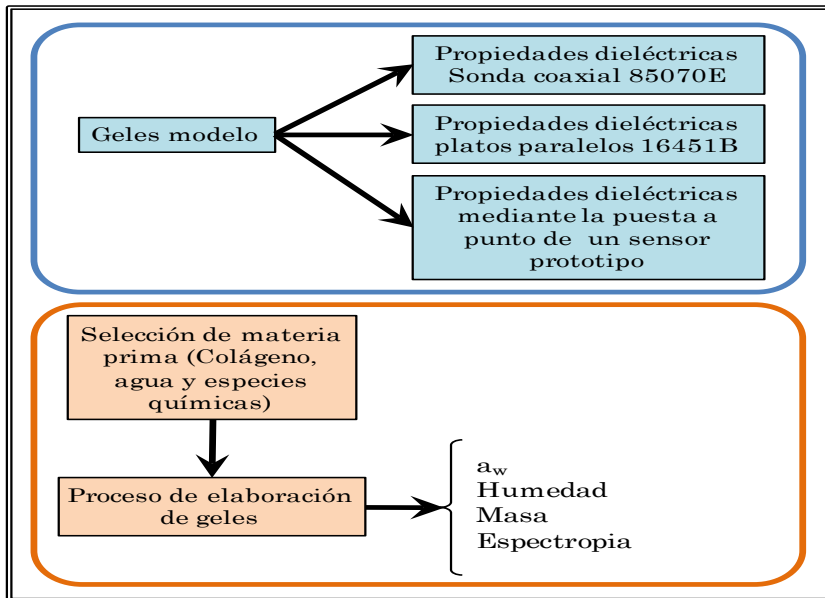


Figura 3.7.1 Diagrama de flujo de las experiencias realizadas para el experimental de geles.

La preparación de los geles de gelatina s condiciones generales para esta operación de gelificación son: se pesó la cantidad de colágeno según se muestra en la tabla 3-3 y por otra parte se calentó agua hasta los 70°C, posteriormente en un vaso de precipitados se puso la cantidad de agua y gel, y se agito con ayuda de un agitador magnético, hasta que el colágeno estuviese completamente disuelto, inmediatamente después se vertió la disolución en recipientes y se pusieron en una cámara a una temperatura de 5°C, los recipientes se cubrieron con parafilm® para evitar la deshidratación en la cámara. Se dejaron reposar por 30 min, posteriormente se atemperaron las muestras a 25°C y se procedió a realizar las medidas.

Tabla 3.3 Composición de los geles patrón; agua y colágeno empleadas en el presente estudio.

Concentración	Colágeno (g)	Agua (g)
7%	4.517	60
10%	6.667	60
15%	10.588	60
20%	15.002	60
20%	11.256	45
25%	15.007	45

Para la medida de las propiedades dieléctricas mediante los platos paralelos Agilent 16451B (electrodo B), conectados a un analizador de impedancias Agilent 4294A, se utilizó un sacabocados cilíndrico de 3 cm y un espesor menor a 10 mm, conforme a las especificaciones del equipo. Estas mismas muestras se utilizaron para las medidas con la sonda coaxial Agilent 85070E y el analizador de redes Agilent E8362B.

Para la medida de a_w se usó un higrómetro de punto de rocío Aqualab® series 3 TE (Decagon Devices, Inc., Washington, 105 USA) fue usado para las mediciones de actividad de agua a 25°C. La humedad se determinó según el método AOAC 935.46 (1997).

La medida de pH se realizó en las muestras de geles. Se utilizó un pH-metro (Mettler Toledo seven easy), con electrodo de contacto para muestras semi-sólidas (Inlab® SolidsPro pH). Previamente el equipo fue calibrado con dos soluciones tampón de valores de pH 4.00 y 7.00 a una temperatura de 20°C. Una vez llevada a cabo la calibración, se limpió el sensor con agua destilada, se secó y la muestra fue colocada en contacto con el electrodo tomándose el valor de pH indicado cuando se estabilizaba la medida en el

equipo. Se efectuaron triplicados de las medidas y se reportó el valor promedio.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Statgraphic ® Plus, versión 5.1 (StatPoint Technologies, Inc, EE.UU.).

4 RESULTADOS

Parte 1

Artículo técnico.

En esta parte de la tesis doctoral se describe la revisión de las investigaciones realizadas en los últimos años, por el grupo de propiedades dieléctricas, del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, de la Universidad Politécnica de Valencia.

Este apartado corresponde con el primer objetivo particular de esta tesis, el artículo tiene por título:

4.1 La utilización de sensores basados en la espectroscopia dieléctrica como una buena herramienta para asegurar la calidad y seguridad alimentaria.

Artículo publicado en la revista:

alimentaria

INVESTIGACIÓN, TECNOLOGÍA Y SEGURIDAD

Nº 442 abril 2013

En este artículo se describe la importancia de desarrollar nuevos métodos rápidos de análisis con el fin de controlar el proceso de elaboración de productos de calidad de una forma segura y eficiente. Tomando como ejemplo dos tipos de alimentos altamente complejos por su nivel estructural, en primer lugar la carne y después el queso.

La utilización de sensores basados en la espectroscopia dieléctrica como una buena herramienta para asegurar la calidad y la seguridad alimentaria

N. Balaguer, J. Velázquez-Varela,
M. V. Traffano-Schiffo,
M. Castro-Giráldez, P.J. Fito*

Instituto Universitario de Ingeniería de
Alimentos para el Desarrollo
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de vera s/n
46022 Valencia, Spain
*pedfidu@tal.upv.es

En los últimos años, la industria agroalimentaria ha alcanzado un elevado grado de desarrollo tecnológico adaptándose a los continuos cambios de la sociedad, a las preferencias de los consumidores, a la gran competitividad del mercado y a la globalización de los mismos. De esta forma la innovación tecnológica juega un rol primordial, teniendo como ejes fundamentales: la seguridad y la calidad de los alimentos mediante el control de las materias primas y los procesos. Ante esta situación, surge la necesidad de desarrollar métodos de análisis y control que aseguren la seguridad y la calidad de manera rápida, sencilla y fiable.

A lo largo del tiempo se han utilizado numerosas técnicas destinadas al análisis y control de procesos en la industria agroalimentaria. Tradicionalmente, dichas técnicas se basan en metodologías analíticas complejas y destructivas que obligan a la realización de protocolos tediosos y a la utilización de la estadística para predecir los riesgos del producto en transformación. Dichos métodos, aunque son considerados precisos, requieren de la destrucción de las muestras, una elevada especialización de los operarios y, frente a una alarma en la

seguridad alimentaria, presentan tiempos largos de reacción y elevados costes.

A raíz de la creciente demanda de las industrias por obtener un producto de forma rápida, efectiva y acorde con los estándares de seguridad y calidad, ha sido necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan optimizar los procesos con el fin de reducir los tiempos de producción y costes operativos. En este contexto, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de sensores basados en la interacción de los materiales con la radiación electromagnética. Se trata de sensores capaces de trabajar en las diferentes regiones que componen el espectro magnético: visible, ultravioleta, infrarrojos, microondas, radiofrecuencia y rayos X.

Actualmente, una de las tecnologías en auge para el desarrollo de dichos sensores es la espectroscopia dieléctrica. De hecho, ésta ocupa un lugar importante entre los métodos utilizados para el análisis físico químico tanto de materiales como de tejidos en diversos campos de investigación: medicina (1-4), industria farmacéutica (5), tecnología de alimentos (6), ciencia de los materiales (7-9), (10). Esta técnica determina las propiedades dieléctricas de los alimentos en función de la frecuencia. Las propiedades dieléctricas pueden ser definidas en términos de su permitividad relativa (6). La permitividad relativa (ϵ_r) es una variable compleja que describe el comportamiento de un sistema frente a la influencia de un campo eléctrico (11-12). Viene definida por la siguiente ecuación:

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (\text{Ecuación 1})$$

La parte real de la permitividad compleja se llama constante dieléctrica (ϵ') y refleja la habilidad del material para almacenar energía cuando el sistema está bajo la influencia de un campo

eléctrico. La parte imaginaria se denomina factor de pérdidas (ϵ'') y está asociada a la absorción y disipación de energía.

Existen numerosos estudios previos que demuestran las ventajas de la utilización de la espectroscopia dieléctrica en la determinación de la seguridad y la calidad de los alimentos, encontrándose aplicaciones en carne y productos cárnicos (13-14), maduración de frutas (15), deshidratación osmótica (16-17), productos lácteos (18), entre otros. En todas ellas, se ha demostrado gran versatilidad y facilidad de análisis, permitiendo llevar a cabo determinaciones en línea no destructivas, altamente fiables y de gran sensibilidad; teniendo como resultado una reducción considerable de los tiempos operativos así como de los costes de producción. Con todo ello, se ha logrado dar un salto desde el análisis de sistemas simples hacia sistemas más complejos como los biológicos.

Actualmente, dos de las industrias más interesadas en adoptar esta herramienta de análisis y control, son la industria cárnica y láctea.

Industria cárnica

Durante las últimas décadas, la industria cárnica se ha convertido en una de las principales beneficiarias de los avances científicos y tecnológicos en materia de calidad y seguridad alimentaria. El cambio en los hábitos de consumo y la adecuación a diversas normativas han fomentado el desarrollo de preparados cárnicos y la aplicación de tecnologías que garantizan tanto la inocuidad, como la preservación de las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos cárnicos.

En este contexto, el mantenimiento de la cadena de frío durante las etapas de procesado y manipulación se ha convertido en uno de los elementos claves que permiten avalar una óptima calidad en la industria cárnica. El hecho de que se produzcan

fluctuaciones de temperatura no deseadas a lo largo del proceso productivo, conlleva una aceleración de los procesos degradativos, con el consiguiente impacto negativo en la seguridad y las características organolépticas en los lotes de fabricación y distribución.

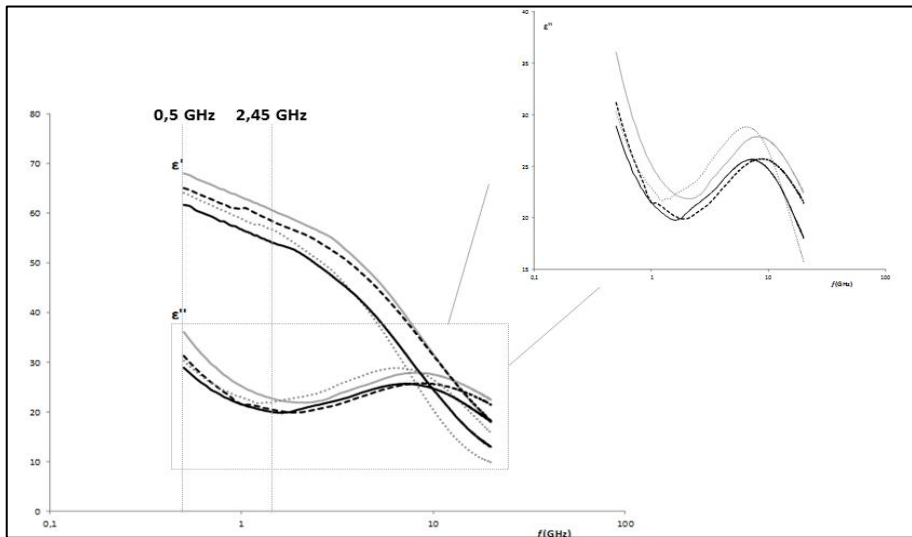


Figura 1. Espectros dieléctricos de lomo de cerdo tras sucesivos ciclos de congelación/descongelación. Espectros dieléctricos ciclo 0 (—); Espectros dieléctricos ciclo 1 (— —); Espectros dieléctricos ciclo 2 (····); Espectros dieléctricos día ciclo 3 (—).

Uno de los problemas que persiste actualmente en el sector cárnico es la carencia de métodos de control vigentes que permitan determinar, de una manera efectiva, rápida y sencilla, si la carne se ha visto expuesta a ciclos de congelación/descongelación, ya sea de manera fraudulenta o bien a causa de fallos técnicos en el funcionamiento de las cámaras de frío. Ante esta problemática, el empleo de técnicas radiantes no destructivas, de fácil implantación en líneas de procesado, constituye una clara y prometedora alternativa, frente a las técnicas analíticas convencionales empleadas en la actualidad.

Tal y como se ha comentado con anterioridad, se han desarrollado trabajos de investigación que demuestran la posibilidad de utilizar la espectroscopia dieléctrica como herramienta tecnológica

para el control de procesos en el sector agroalimentario. Teniendo en cuenta estos precedentes, uno de los objetivos que se plantean es analizar la viabilidad de utilizar las propiedades dieléctricas, en el rango de las microondas, para determinar si la carne ha sido sometida a más de un ciclo de congelación/descongelación. Para ello, se diseñó un procedimiento experimental en el que varias piezas de lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*), tras ser fisicoquímicamente caracterizadas, fueron sometidas a un total de 3 ciclos de congelación/descongelación, en condiciones de humedad y temperatura controladas. En cada uno de dichos ciclos, se realizaron las correspondientes medidas de los espectros dieléctricos en el rango de frecuencia comprendido entre 0.5 y 20 GHz. Paralelamente, se efectuó un análisis de microscopía electrónica de barrido para analizar los cambios microestructurales que se producen en la carne, como consecuencia de haber estado expuesta a reiterados ciclos de congelación/descongelación.

En la Figura 1 se muestra el espectro de la constante dieléctrica (ϵ') y del factor de pérdidas (ϵ'') a lo largo de los diferentes ciclos de congelación descongelación estudiados. En la parte superior derecha, se detalla una ampliación del espectro del factor de pérdidas.

Tal y como se puede observar, se aprecian diferencias en los espectros a medida que se incrementa el número de ciclos. Estas diferencias están intrínsecamente relacionadas con la progresiva desestructuración del tejido muscular y por ende, con el cambio que se produce en la distribución y el comportamiento de la fase líquida en el interior del sistema. Una evidencia objetiva de que dicha desestructuración está teniendo lugar se refleja en la Figura 2.

En la Figura 2, se muestran micrografías de secciones transversales de carne fresca (2a) y de carne congelada/descongelada (2b) tras el 3er ciclo de

congelación/descongelación. En ambas micrografías, se observan detalles de las fibras musculares constituidas fundamentalmente por miofibrillas y recubiertas de tejido conectivo endomisial; una estructura reticular formada principalmente por colágeno y encargada de mantener la adhesión entre las fibras musculares. La principal diferencia entre ambas micrografías estriba precisamente en la integridad de esta estructura. Someter a la carne a ciclos de congelación/descongelación ha provocado una degradación y desestructuración del tejido conectivo, dando lugar a la generación de espacios intermiofibrilares mucho más grandes e irregulares.

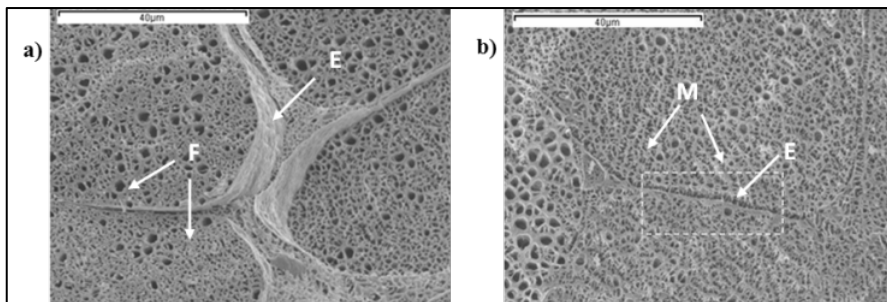


Figura 2. Micrografías de Cryo-SEM. a) Carne fresca 1500x, b) Carne congelada/descongelada 1500x. Dónde: F) Fibras, E) Endomisio, M) Miofibrillas.

Para evaluar si realmente las diferencias observadas en los espectros obtenidos eran significativas, se seleccionaron las frecuencias puntuales de 0,5 y 2,45 GHz de los espectros de la constante dieléctrica (ϵ'), con el fin de definir un factor dieléctrico que pudiera utilizarse como algoritmo de control de la ruptura de la cadena de frío (Ecuación 2). La razón por la cual se escogieron las frecuencias de 0,5 y 2,45 GHz se debe a que son consideradas, respectivamente, clave en el rango de predominancia del mecanismo de pérdidas por conductividad iónica y característica de los magnetrones empleados actualmente a nivel industrial.

$$fd = \epsilon'_{0,5\text{GHz}} + \epsilon'_{2,45\text{GHz}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

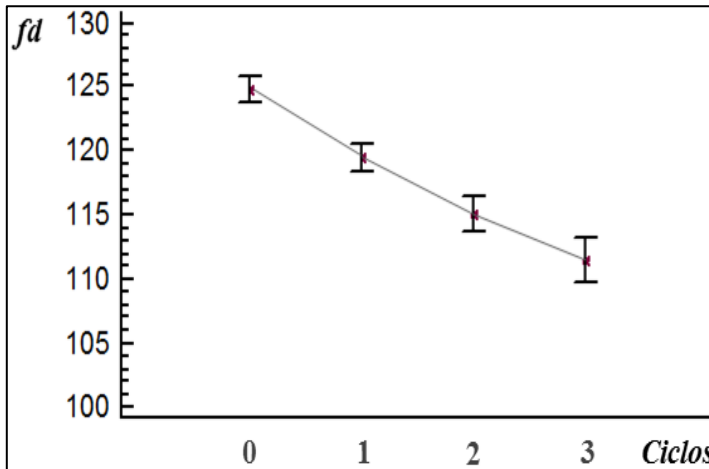


Figura 3. Gráfico LSD. Evolución del factor dieléctrico tras sucesivos ciclos de congelación/descongelación.

En la Figura 3 se muestra la evolución del factor dieléctrico (fd), en forma de gráfico de intervalos LSD (*Least Significant Difference*), a lo largo de los diferentes ciclos de congelación/descongelación.

Se puede observar, efectivamente, que sí existen diferencias significativas en el valor que adquiere el fd a medida que se incrementa el número de ciclos. Del gráfico LSD se deduce que la tendencia del fd es adoptar valores cada vez más bajos. Tal y como se ha explicado anteriormente, este comportamiento está asociado a los cambios estructurales que ejercen los procesos de congelación/descongelación sobre la integridad del tejido muscular. Como resultado de la desestructuración provocada se produce una pérdida gradual de fase líquida y en consecuencia, una disminución progresiva de la movilidad de las especies iónicas presentes en el medio. Por tanto, dado que queda reflejado que existen diferencias significativas en el fd , conforme se van produciendo los distintos ciclos de congelación/descongelación, se demuestra que la espectroscopia dieléctrica es una herramienta tecnológica apta, para ser transferida como método de control de la conservación de la cadena de frío en la industria cárnica.

Industria láctea

La industria láctea representa un sector fundamental en el tejido empresarial español, tanto por el número de grandes empresas como por el número de pequeños productores. La disparidad en las técnicas de producción entre las grandes y las pequeñas empresas, aumentan notablemente la complejidad en el desarrollo de técnicas de control en línea que permitan mantener los estándares de calidad y seguridad alimentaria.

La fabricación de queso es un proceso complejo que implica varias etapas y diferentes transformaciones bioquímicas y estructurales, influyendo en la composición y la calidad final del producto. Una de las etapas fundamentales para desarrollar la calidad final del producto y para preservar la seguridad del mismo, es la etapa de salado. Uno de sus principales problemas radica en la dificultad de controlar los flujos simultáneos de agua, cloruro sódico (NaCl), e iones y solutos nativos, así como las transformaciones proteicas, fundamentalmente de la caseína, durante todo el proceso. Como ya se ha comentado anteriormente, las propiedades dieléctricas están estrechamente relacionadas con la estructura y la composición de los alimentos. En este contexto, la espectroscopia dieléctrica surge como una herramienta que puede ser implementada en la propia línea de procesado y que permite detectar los puntos críticos de la operación de salado. Se han realizado diversos estudios para analizar la composición y el proceso de maduración de queso mediante la utilización de las propiedades dieléctricas (19-22).

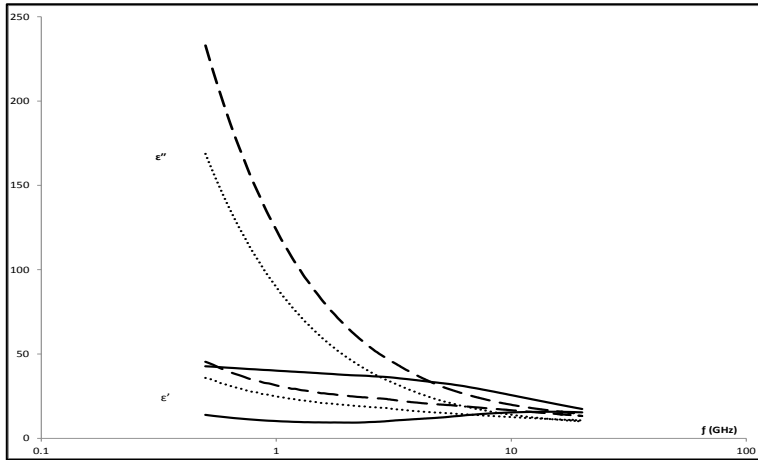


Figura 4. Evolución de los espectros dieléctricos de las muestras de queso durante el tratamiento, donde: (—) 0 min (muestra sin salar), (— —) 30 min de salado, (····) 6 horas de salado.

Con el objetivo de analizar el proceso de salado mediante propiedades dieléctricas, se realizó un proceso de salado de queso en disolución saturada de cloruro sódico. A distintos tiempos de tratamiento se extrajeron muestras de queso y se les midió el espectro dieléctrico mediante una sonda coaxial Agilent 85070E conectada a un analizador de redes Agilent E8362B en un rango de frecuencia de 0,5 a 20 GHz. Se analizaron los cambios microestructurales mediante microscopia electrónica de barrido. Además se midieron los iones mediante HPLC, la humedad, la actividad de agua y el volumen de las muestras.

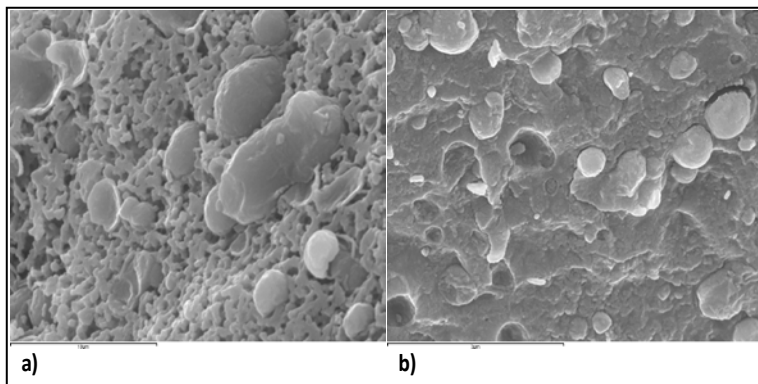


Figura 5. Micrografías de queso durante el tratamiento de salado donde: (a) queso fresco (5000x), y (b) 1440 minutos de salado (3500x).

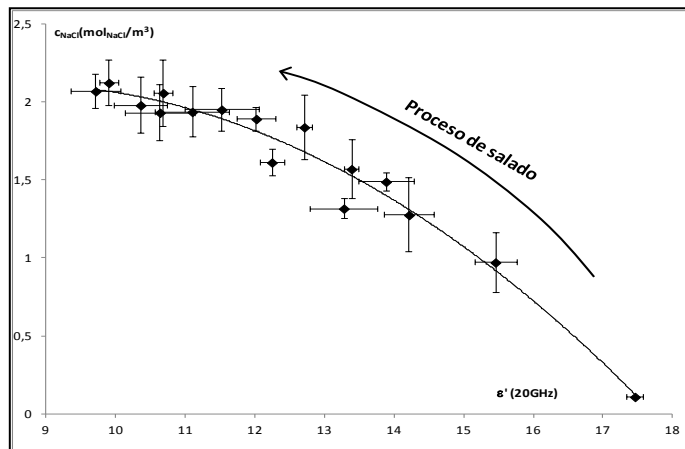


Figura 6. Relación de la constante dieléctrica a 20 GHz con la concentración molar de cloruro sódico en fase líquida durante el proceso de salado de queso.

Los espectros dieléctricos mostrados en la figura 4, muestran una elevada variación del factor de pérdidas a frecuencias bajas. Este incremento del factor de pérdidas está asociado al aumento de la conductividad iónica producido por el salado. Por otro lado, a altas frecuencias del espectro se observa una disminución de la constante dieléctrica asociada a la disminución de movilidad del agua, factor fundamental para asegurar la seguridad alimentaria en este tipo de producto. Por esta razón, es posible utilizar la constante dieléctrica a altas frecuencias para asegurar un nivel de salado adecuado para este producto. Al analizar los cambios microestructurales del queso durante el salado (ver figura 5), es posible ver un cambio en la conformación de la red de caseínas, asociada a la variación de cargas en el medio. Por otra parte, la correlación con el nivel de salado es tan exacta (ver figura 6) que se puede predecir el nivel final de cloruro sódico en fase líquida, que se encuentra directamente relacionado con las características sensoriales del queso (tanto de sabor como de textura).

Conclusiones

Los sensores dieléctricos permiten determinar si una muestra de carne congelada ha sufrido hasta tres ciclos de congelación

durante el periodo de almacenamiento. Mostrándose como una excelente herramienta de seguridad alimentaria.

Los sensores dieléctricos permiten, a su vez, controlar los procesos de salado de queso, determinando las transformaciones del mismo y preservando el mejor nivel de calidad.

Por tanto los sensores basados en la espectroscopia dieléctrica son una buena herramienta para el control de fabricación de productos alimentarios, desde el punto de vista de la calidad y seguridad de los mismos.

Bibliografía

- 1.- Aimoto, A. & Matsumoto, T. (1996). Non-invasive method for measuring the electrical properties of deep tissues using an open-ended coaxial probe. *Med. Eng. Phys.*, 18, 641-646.
- 2.- Fear, E.C., Hagness, S.C., Meaney, P.M., Okoniewski, M. & Stuchly, M.A. (2002). Enhancing breast tumor detection with nearfield imaging. *IEEE Microwave magazine*, 3(1), 48-56.
- 3.- Fear, E.C., Meaney, P.M. & Stuchly, M.A. (2003). Microwaves for breast cancer detection?. *IEEE Potentials*, 22(1), 12-18.
- 4.- Peebles, D.M., Edwards, A.D., Wyatt, J.S., Bishop, A.P., Cope, M. & Delpy, D.T. (1992). Changes in human fetal cerebral hemoglobin concentration and oxygenation during labor measured by near-infrared spectroscopy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 166, 1369-1373.
- 5.- Smith, G., Duffy, A.P., Shen, J. & Olliff, C.J. (1995). Dielectric relaxation spectroscopy and some applications in the pharmaceutical sciences. *Journal of Pharmacy Science*, 84, 1029-1044.
- 6.- Sosa-Morales, M. E., Valerio-Junco, L., López-Malo, A. & García, H. S. (2010). Dielectric properties of foods: Reported data

in the 21st Century and their potential applications. *LWT–Food Science and Technology*, (8), 1169-1179.

7.- Adous, M., Quéffélec, P. & Laguerre, L. (2006). Coaxial/cylindrical transition line for broadband permittivity measurement of civil engineering materials. *Measurement Science and Technology*, 8, 2241-2246.

8.- Goy, B., Martin, P. & Leban, J.M. (1992). The measurement of wood density by microwave sensor. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 50,163-166.

9.- Martín, P., Moroño, A. & Hodgson, E.R. (2004). Cuarzo KU1 de alta resistencia a la radiación. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 43(2), 452-454.

10.- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J. & Fito, P. (2010). Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, 97 (4), 484-490.

11.- Metaxas, A. C. & Meredith, R. J. (1993). *Industrial microwave heating*. IEE Power. Engineering series 4. London, UK: Peter Peregrinus LTD. Metaxas, A. C., & Meredith, R. J. (1993). *Industrial microwave heating*. IEE Power. Engineering series 4. London, UK: Peter Peregrinus LTD.

12.- Nelson, S. O. & Datta, A. K. (2001). Dielectric properties of Food Materials and Electric Field Interactions. In A. K. Datta & R. C. Anantheswaran (Eds.), *Handbook of Microwave Technology for Food Applications* (pp. 69–114). New York: Marcel Dekker.

13.- Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F. & Fito, P. (2010). Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (2), 376-386.

14.- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Chenoll, C. & Fito, P., (2010). Development of a dielectric spectroscopy technique for the

determination of apple (Granny Smith) maturity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (4), 749-754.

15.- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Chenoll, C. & Fito, P., (2010). Development of a dielectric spectroscopy technique for determining key chemical components of apple maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3761-3766.

16.- Castro-Giráldez, M., Tylewicz, U., Fito, P. J., Dalla Rosa, M. & Fito, P. (2011). Analysis of chemical and structural changes in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward) through the osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 105 (4), 599-608.

17.- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Dalla Rosa, M., & Fito, P. (2011). Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling osmotic dehydration of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12 (4), 623-627.

18.- Fagan, C. C., Everard, C., O'Donnell, C. P., Downey, G. & O'Callaghan, D. J. (2005). Prediction of inorganic salt and moisture content of process cheese using dielectric spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 8 (3), 543-557.

19.- Ball, J. A. R., Horsfield, B., Holdem, J. R., Keam, R. B., Holmes, W. S. & Green, A. (1996). Cheese curd permittivity and moisture measurement using a 6-port reflectometer. In *Asia Pacific Microwave Conference*, New Delhi, December 1996.

20.- Green, A. D. (1997). Measurements of the dielectric properties of Cheddar cheese. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 32, 16-27.

21.- Herve, A. G., Tang, J., Luedecke, L. & Feng, H. (1998). Dielectric properties of cottage cheese and surface treatment using microwaves. *Journal of Food Engineering*, 37, 309-410.

22.- Kubis, I., Krivanek, I. & Gajdusek, S. (2001). The relationships between the chemical, dielectric and sensory

properties of Edam cheese during ripening. *Czech Journal of Food Science*, 19, 85–89.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Ministerio Español de Ciencia e Innovación su apoyo económico mediante el proyecto AGL2011-30096. La autora Marta Castro Giráldez quiere agradecer al Campus de Excelencia Internacional VLC/CAMPUS por su apoyo económico. El autor J. Velázquez-Varela quiere agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México su apoyo.

Parte 2

En esta parte de la tesis doctoral se describe los resultados obtenidos tras la consecución del segundo objetivo particular planteado, dando lugar a la publicación;

4.2 Control of the brewing process by using microwaves dielectric spectroscopy

Artículo publicado en:

Journal of food Engineering

Vol. 119 (2013) p 633–639

La calidad engloba las características más importantes que un producto debe cumplir, satisfaciendo las demandas del consumidor, y la seguridad alimentaria. Por tanto el control de la calidad debe operar en diferentes niveles y a lo largo del sistema de producción.

En este sentido el desarrollo y aplicación de métodos novedosos, contribuye a obtener resultados precisos, rápidos y de elevada confiabilidad.

Los esfuerzos por simplificar los métodos de control de calidad, están centrados en que puedan ser establecidos directamente en la línea de producción. En este sentido, hace necesaria la investigación, y desarrollo.

A continuación se presenta el artículo donde se muestra la aplicación de un sensor para el control de la fermentación en la fabricación de cerveza.

Journal of Food Engineering 119 (2013) 633–639

Contents lists available at Science Direct

Journal of Food Engineering

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng

Control of the brewing process by using microwaves dielectric spectroscopy

J. Velázquez-Varela, M. Castro-Giráldez, P.J. Fito *

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Keywords:

Dielectric spectroscopy

Fermentation

Ethanol

Beer

Brewing

ABSTRACT

Dielectric spectroscopy in microwave and radiofrequency region is an emerging control technique used to obtain information about the transformation of biological systems. In microwave region, the main interaction is produced with different food constituents and water molecule. In this context, the dielectric properties were analyzed during beer production in order to improve beer quality. There were also analyzed the most important physical and chemical properties of beer through the process. Good correlations were found between loss tangent at 10 GHz and the ethanol and sugars concentration. Therefore, this technique can be used as a fast, accurate and non-destructive control method of beer production.

©2013 Elsevier Ltd. All rights reserved

*Corresponding author. Tel.: +34 963879832; fax: +34 963879832. E-mail address: pedfis@tal.upv.es (P.J. Fito).

0260-8774/\$ - see front matter 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.032>

NOTATION

M - Mass, (Kg).
G - Generation, (Kg).
x - Mass fraction, (—).
N - Number of cell, (cell/mL)
r - Ratio, (Kg/min)
t - Time, (hours).
E - Ethanol
F - Fermentation
f - Frequency (GHz)
tang δ - Loss tangent(—)
 ϵ' - dielectric constant (—).
 ϵ'' - loss factor (—).

Sub-indexes:

F - Fructose
G - Glucose
M - Maltose
S - Sucrose
CO₂ - Carbon dioxide (chemical formula)
0 - initial time

Super-indexes:

0 - initial time
F - Fermentation
t - Time, (h)
H - Hydrolysis

1. Introduction

Brewing is considered as an example of traditional biotechnology, because of its extremely ancient history. However, its industry applies new technical, genetic and microbiological advances in order to improve this process. Among others, it can be cited the highgravity beer fermentation (Pidcocke et al., 2009), immobilized yeast bioreactor (Tata et al., 1999) and genetic modifications of yeast strains to change some parameters of the final beer (Blicek et al., 2007; Nevoigt et al., 2002).

The composition of beer is complex and very variable depending of the kind of beer. According to Preedy et al. (2009), beer can be composed by more than 1000 compounds, the most important are: water, ethanol, carbohydrates and carbon dioxide. There exist numerous analytical methods for detecting these components. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) makes possible the evaluation of carbohydrates and alcohol content (Panteloglou et al., 2010; Pidcocke et al., 2009; Zengran et al., 2008). Other authors optimized and validated an HPLC method

with an Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) for the quantification of carbohydrates in the beer (Nogueira et al., 2005). On the other hand, the ethanol production during the fermentation process can be determined by NIR spectroscopy (Cavinato et al., 1990; Iñon et al., 2006; McLeod et al., 2009). The quantification of the escaped carbon dioxide can be measured by mass spectroscopy (Bideaux et al., 2006).

The gas chromatography is used in order to determine total diacetyl, ethanol, and the flavor and aroma compounds (Castritius et al., 2010; McLeod et al., 2009; Zengran et al., 2008; Šmogrovicová and Dömén, 1999). In recent years, other techniques have been used to improve different processes in order to obtain a better quality of the final product (Castro-Giráldez et al., 2010a). In this context, microwave dielectric spectroscopy is a non-destructive technique that has been recently used to on-line quality control of foods. Microwaves are part of the non-ionizing radiation and their frequency range spread from 100 MHz to 100 GHz (Kent et al., 2001). This technique has been also used in numerous investigation fields as medicine (Treo and Felice, 2009), pharmaceutical industry (Wojnarowska et al., 2011; Smith et al., 1995) and material sciences (Adous et al., 2006; Labidi et al., 2011). In food technology, this technique has been used for controlling the osmotic dehydration of apple (Castro-Giráldez et al., 2011a) and kiwifruit (Castro-Giráldez et al., 2011b), for determining the fruit ripening of apple (Castro-Giráldez et al., 2010b), for determining the salt content in butter (Shiinoki et al., 1998), characterization of alcoholic beverages and solutions of ethanol in water (Bohigas and Tejada, 2010), in the study of desalted cod (De los Reyes et al., 2009), to observe the behavior of beef meat during maturation (Damez et al., 2008), to monitor changes in the dielectric properties of whole meat across a temperature range (Brunton et al., 2006), to determine the dielectric properties of a whey protein gel, a liquid whey protein

mixture (Wang et al., 2003) and also to detect the whey protein denaturation (Bircan et al., 2001).

Complex permittivity (ϵ_r) is the dielectric property that provides information about the interaction between electromagnetic energy and the food (Datta and Anantheswaran, 2001; Metaxas and Meredith, 1993). It can be defined as:

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (1)$$

where ϵ' is the real part or dielectric constant and describes the ability for a material to store energy when it is subjected to an electric field. ϵ'' is the imaginary part, or loss factor, and represents the ability of the material to dissipate the electromagnetic energy, which commonly results in heat generation.

The objective of this work was to measure the dielectric properties during the beer fermentation process, in order to control the quality of this beverage.

2. Materials and methods

2.1. Standard solutions

Standard solutions simulating the lager wort and lager beer composition were prepared. Their composition was based in bibliographic sources (Preedy, 2009). Moreover, sugar composition was obtained mixing 40% of maltose, 40% of sucrose, 10% of fructose, and 10% of glucose.

2.2. Beer experimental

Preliminary studies were done at the same working conditions, in order to select the measure times of fermentation process.

The beer was prepared using 115 g of commercial malt syrup with 0.35 g commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Brewmaker Original Lager Kit, Mr. Malt, Italy), adding 60 g of pure sucrose and 1.5 L of distilled water.

Three different fermenters were used for beer production at 22°C. At different times (12, 24, 36, 54, 60, 72, 75, 78, 84, 96 h), three aliquots were taken from each fermenter and tempered at 25°C for measuring dielectric spectra, ethanol content, refractometry index, spectrophotometry and sugar chromatography. The carbon dioxide content was obtained by stoichiometry.

2.3. Dielectric properties measurement

The system used to measure dielectric properties consist of an Agilent 85070E open-ended coaxial probe connected to an Agilent E8362B vector network analyzer. The system was calibrated by using three different types of loads: air, short circuit and 25°C Milli-Q water. Once the calibration was made, 25°C Milli-Q water was measured again to check calibration suitability. All determinations were made at 25°C from 500 MHz to 20 GHz by introducing the coaxial probe at least 5 mm into the sample. Three measurements were done for every sample.

3. Physical–chemical analysis

An industrial densitometer was used at the beginning of the treatment for determining the ethanol content (OIV, 2004). Ethanol content was also estimated by using the transmittance measurement, previously calibrated by standard solutions of sucrose, ethanol and water mixtures (Labianca, 1996), in order to obtain a better control of ethanol quantity.

The transmittance of the sample was measured by using an UV/visible spectrophotometer at 600 nm (Helios Zeta v8.00 serie No. 164405).

The refractometry Index was determined by a refractometer (ABBE, ATAGO Model 3-T, Japan).

Sugars quantification was carried out by means of an ion chromatograph (Metrohm Ion Ltd., Switzerland) using a column (Metrosep carb 1: 250/4,6) and a precolumn Metrosep carb 1

Guard). The mobile phase was a solution of NaOH 0.1 M. The samples were centrifuged (J.P. Selecta S.A., Medifriger-BL, Barcelona, Spain) at 4000 rpm during 20 min. 1 mL of supernatant was diluted with Milli-Q water in a 100 mL Erlenmeyer flask. The dilution was filtered through a 0.45 μm Millipore filter and 15 mL was used to analyze the sugars content.

Analytical determinations described above were obtained by triplicate. Statistical analysis was carried out with the Statgraphic Plus, version 5.1 (Statpoint Technologies, Inc., USA).

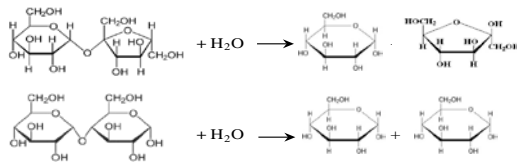
4. Results

Beer production is the result of some biochemical reactions coupled; these reactions produce fermentable monosaccharides, ethanol, carbon dioxide and some important compounds responsible of the beer flavors (Olmi et al., 2007); all these compounds produce the final quality characteristics of beer. The hydrolysis of maltose and sucrose occurs simultaneously with the fermentation reaction producing monosaccharides (see reaction in Fig. 1). Weight evolution was calculated applying an ethanol balance through the fermentation reaction with the hypothesis that all the carbon dioxide leaves the solution (obtained by stoichiometry relation with the ethanol).

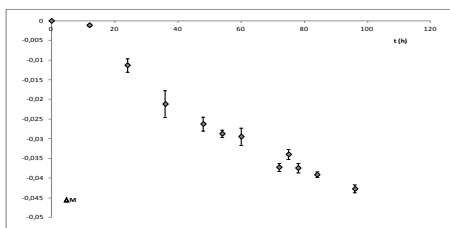
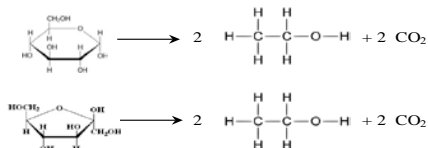
The maltose concentration was calculated following the balances exposed in Fig. 1, using the glucose, fructose and sucrose concentration measured and the initial maltose concentration obtained from the overall sugars measured by refractometry in beer wort without yeast. The weight loss curve through the process is shown in the same figure.

Reactions:

Hydrolysis



Fermentation



Estimation pathway:

Weight losses

$$M^t_{Supposed} \rightarrow G^t_E = M^t_{Supposed} \cdot x^t_E$$

$$\rightarrow \frac{G^t_{CO_2}|^F}{2 * 44} = \frac{G^t_E|^F}{2 * 46} = \frac{G^t_{G,F}|^F}{180}$$

$$M^t_{Calculated} = M_0 - G^t_{CO_2}|^F \leftarrow$$

$$f(Error) = \sum (M^t_{Supposed} - M^t_{Calculated})^2 \rightarrow M^t$$

Glucose & Fructose Balance

$$M^0 \cdot x_{G,F}^0 + G^t_{G,F}|^H - G^t_{G,F}|^F = M^t \cdot x_{G,F}^t$$

$$G^t_{G,F}|^H = \frac{180 \cdot G^t_{M,S}|^H}{342} \quad G^t_S|^H = M^t \cdot x^t_S$$

$$G^t_{M,S}|^H = G^t_M|^H + G^t_S|^H \quad x^0_M (refrac_measured)$$

$$x^t_M = \frac{M^0 \cdot x^0_M - G^t_M|^H}{M^t}$$

Fig. 1. Estimation pathway, where: M represents the mass, G is the generation, and x is the mass fraction; subscript E represents ethanol, G is glucose, F is fructose, M is maltose, S is sucrose; and superscript t represents time, F is fermentation, H is hydrolysis, and O is initial time.

Fig.2 shows the evolution of some representative sugars through the fermentation and hydrolysis. During the first 12h, sucrose concentration decreases by the hydrolysis reaction drastically, while glucose and fructose concentrations suffer a slight increase caused by the coupled effect of the hydrolysis and fermentation reactions. After this time, the concentration of all these sugars decreases. In the figure, it is also possible to appreciate that fructose concentration falls more slowly than glucose concentration; this could be explained because the glucose is preferentially and rapidly utilized by the yeast cells (Alves et al., 2008). In the figure, it is possible to observe that the maltose concentration decreases after 24h, when most of glucose is depleted as was observed by other authors (Denny, 2009).

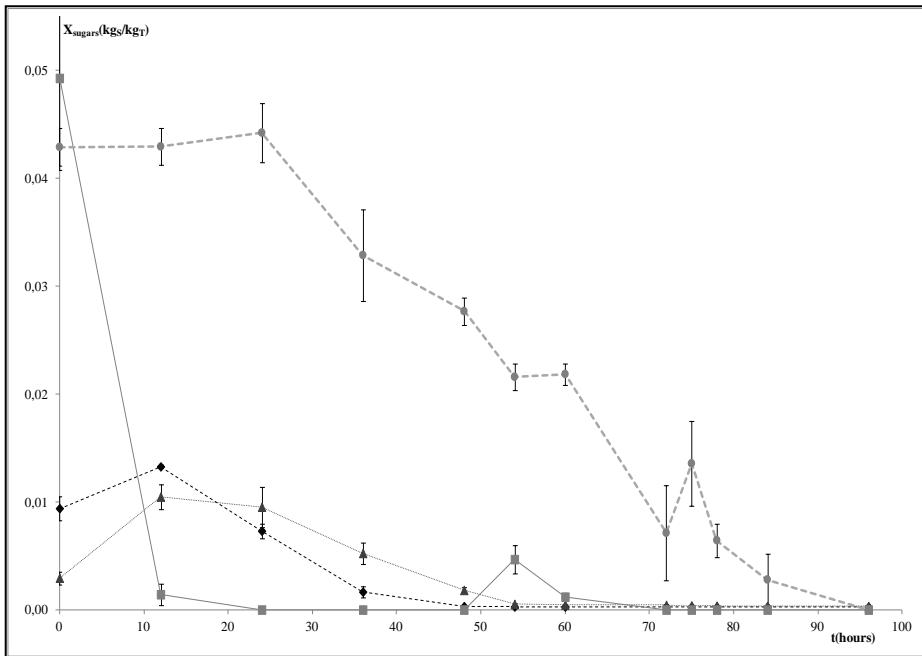


Figure 2. Mass fraction of fermented sugars, where: glucose (♦), fructose (▲), sucrose (■), and maltose (●).

The yeast growth data, in fermentation process, has been obtained by spectrophotometry following the relationship between the absorbance at 600 nm and the yeast population for lager beer published by Held (2010). Thus, it is possible to estimate the Yeast Growth Curve (YGC) and it is shown in Fig. 3a. As it is shown in Fig. 1, the ethanol is produced in fermentation by the catalysis of yeast; Fig. 3b shows how the quantity of ethanol increases with the growth of yeast population. Nevertheless, the ratio of ethanol production, defined as an increment of ethanol generated by process time ($\Delta G_E/\Delta t$), reaches a maximum at $1.2 \cdot 10^7$ cells/mL of yeast population, which corresponds with 36 h of reaction. Moreover, the production of ethanol is associated directly with the decrease in sugar content (Fig. 3c), due to the fact that sugars represent the main substrate of yeast growth.

Some standard solutions simulating the lager wort and lager beer composition were prepared in order to analyze the effect of the most important components of beer on the dielectric spectra. The analysis of standard solutions allows identifying the most important frequencies to control beer production.

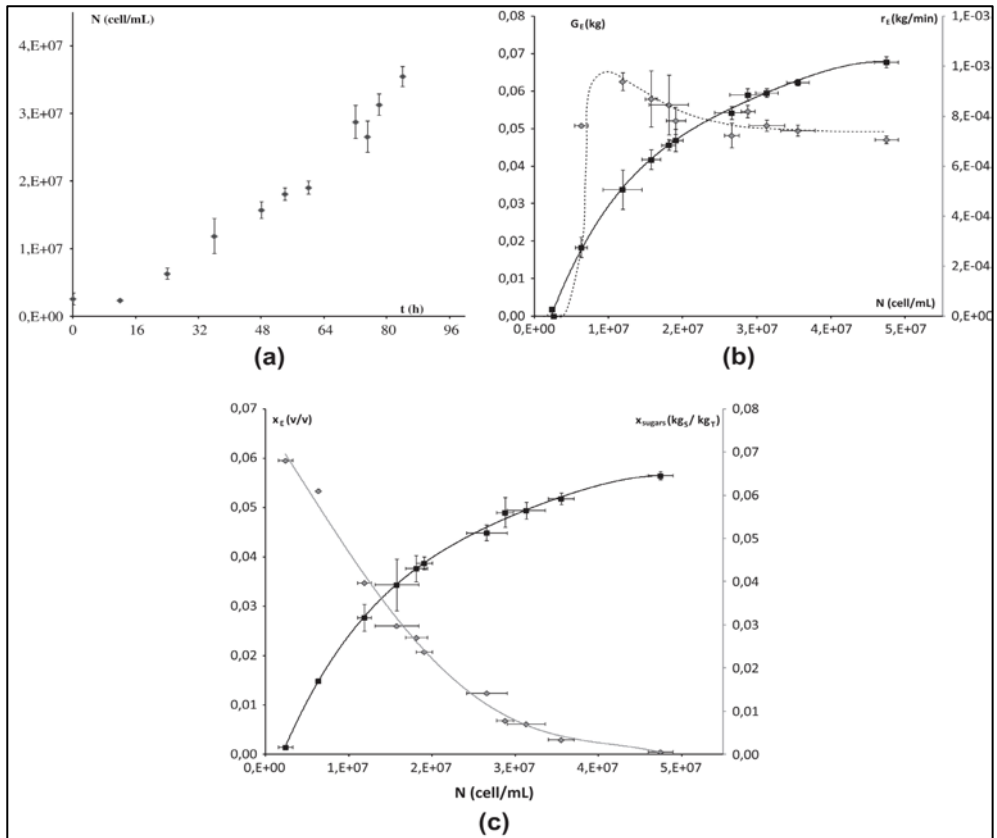


Figure 3. (a) Yeast Growth Curve. (b) Relationship of yeast growth with ethanol generation (■) and with ratio of ethanol (◆). (c) Relationship of yeast growth with ethanol concentration (v/v) (■) and with sugar concentration (w/w) (◆).

Fig. 4 shows the spectra of the standard solutions of water and ethanol. In the figure, it is possible to observe that the increase of alcohol content produces a decrease of dielectric constant spectra and a decrease in the relaxation frequency. In this case, ethanol molecule works as a solute in water solution, it produces H-bonds in the OH group, reducing the free rotation of the water molecule (Sato and Buchner, 2004). The result of this interaction produces a reduction in the molecular motion of water, in its interaction with other molecules, and also in its capability to store or dissipate the electromagnetic energy. Thus, the increment of the ethanol concentration reduces the dielectric constant and the loss factor.

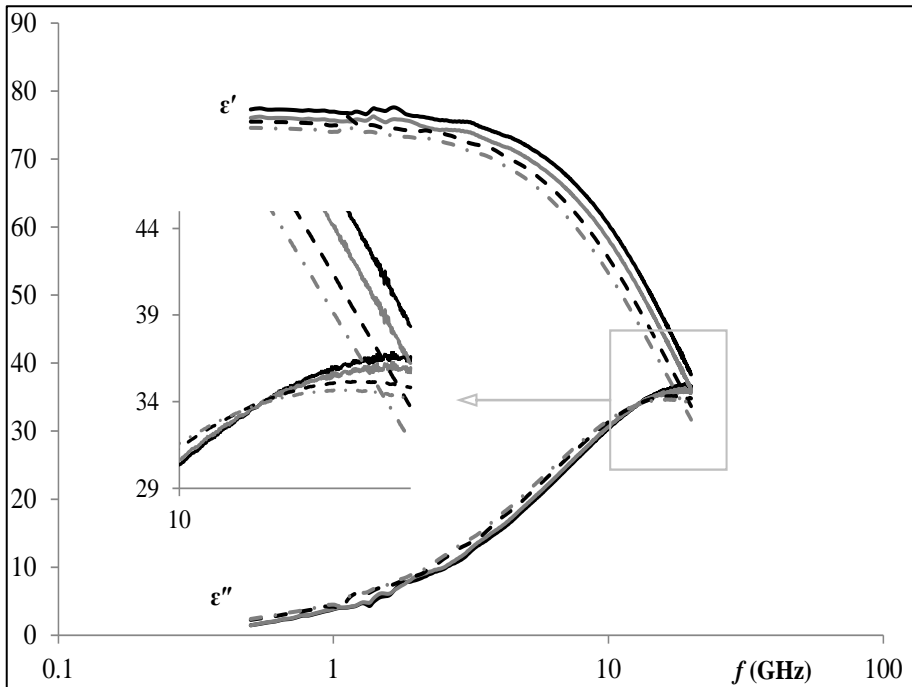


Figure 4. Dielectric spectra of standard solutions of water and ethanol, where: (—) 2% of ethanol (v/v), (---) 4% of ethanol (v/v), (- · -) 6% of ethanol (v/v), (· · ·) 8% of ethanol (v/v).

There were also measured solutions of water and sugars (Fig. 5). In the figure, it can be observed that sugar molecules produce a decrease in dielectric constant and loss factor spectra with regard to dielectric spectra of pure water at dipolar dispersion frequencies. This effect is due to the fact that sugar molecules can form hydrogen bonds with water dipoles, limiting its movement and decreasing its polarization capacity. For this reason, dipolar dispersion is displaced to minor frequencies of the spectrum, decreasing dipolar relaxation frequency (Castro-Giráldez et al., 2010a).

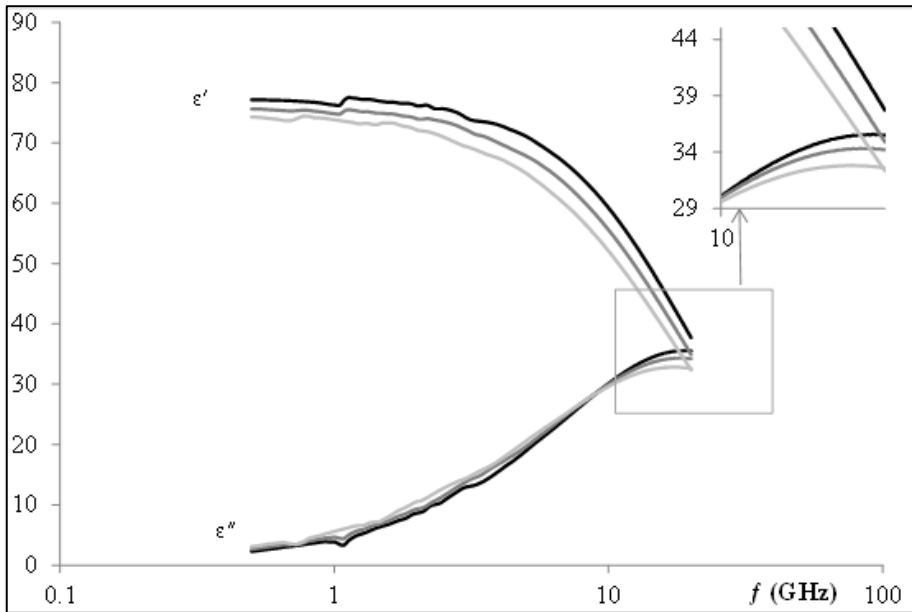


Figure 5. Dielectric spectra of standard solutions of water and sugars, where: (—) 5%, (---) 10%, (· · ·) 15% of sugar concentration (w/w).

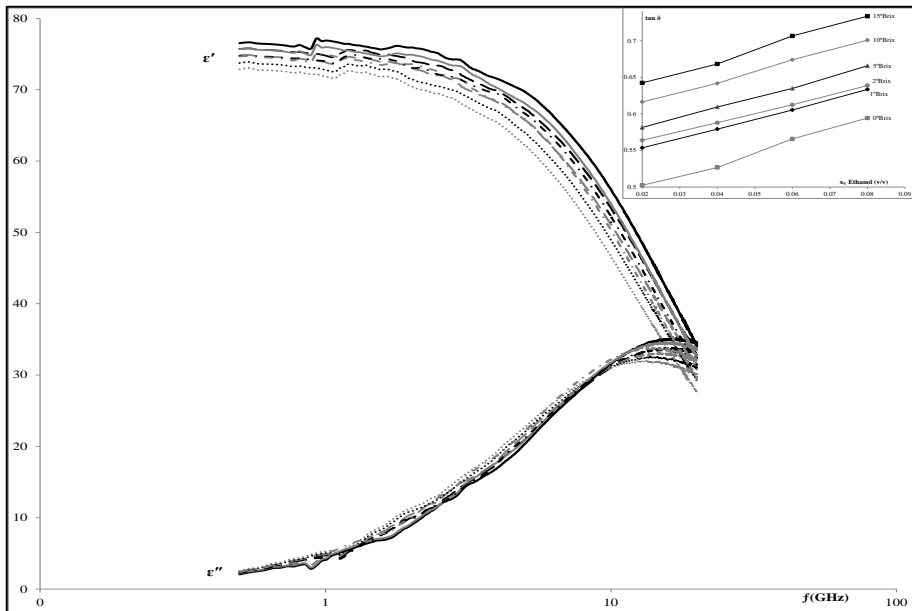


Figure 6. Dielectric spectra of standard solutions of water-ethanol- sugar expressed as % of ethanol (v/v) and % of sugar concentration (w/w), respectively; where: (—) 2% and 2%; (---) 4% and 2%; (- · -) 6% and 2%; (- - -) 8% and 2%; (- · · -) 2% and 5%; (- · - ·) 4% and 5%; (· · · ·) 6% and 5%; (· · · · ·) 8% and 5%. In the top right side, the relation of $\tan \delta$ at 10 GHz with ethanol concentration (v/v) is shown; in all the cases, the sugar concentration is indicated beside every curve.

There were prepared standard solutions of water, ethanol and sugars (Fig. 6a). Carbohydrates and ethanol have similar interactions with water molecules in the dissipation and storage of electric energy; a useful tool to share both interactions with water is the loss tangent. The loss tangent represents the tangent of the permittivity phase (δ) and relates the dissipation with the storage of electric energy. It was calculated as the ratio of the real and imaginary parts of permittivity ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$) (Tang, 2005).

In order to obtain clear information, there were analyzed the loss tangent spectra, identifying the frequencies near the relaxation frequency as the range with more capability to share out the effect of sugars and ethanol in the water molecule. It is possible to observe in Fig. 6b how the ethanol and sugar concentrations are straight related with the loss tangent at 10 GHz.

The dielectric spectra of beer were measured during the fermentation process at different times in order to analyze if the compositional changes can be detected by dielectric spectroscopy. Moreover, it was studied if the loss tangent at 10 GHz can be a useful tool in the control of real beer production (Fig. 7).

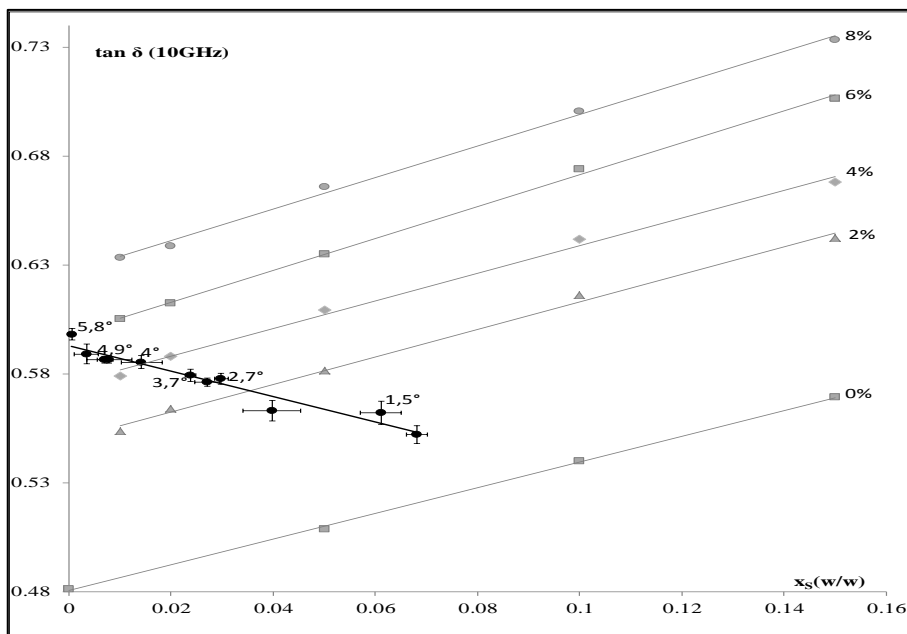


Figure 7. Relation of $\tan \delta$ at 10 GHz with sugar concentration, where: grey symbols represent the standard solutions of water, ethanol and sugars; black symbols represent the beer samples. In all the cases, the ethanol content is indicated beside every curve or point.

As it has been explained along the paper, the fermentation process produces a decrease in the sugar concentration of the wort, producing ethanol as a product. In Fig. 7, it is possible to observe that the loss tangent reflects this decrease of sugar and the increase in ethanol, yielding to a direct relation during the process (Fig. 8).

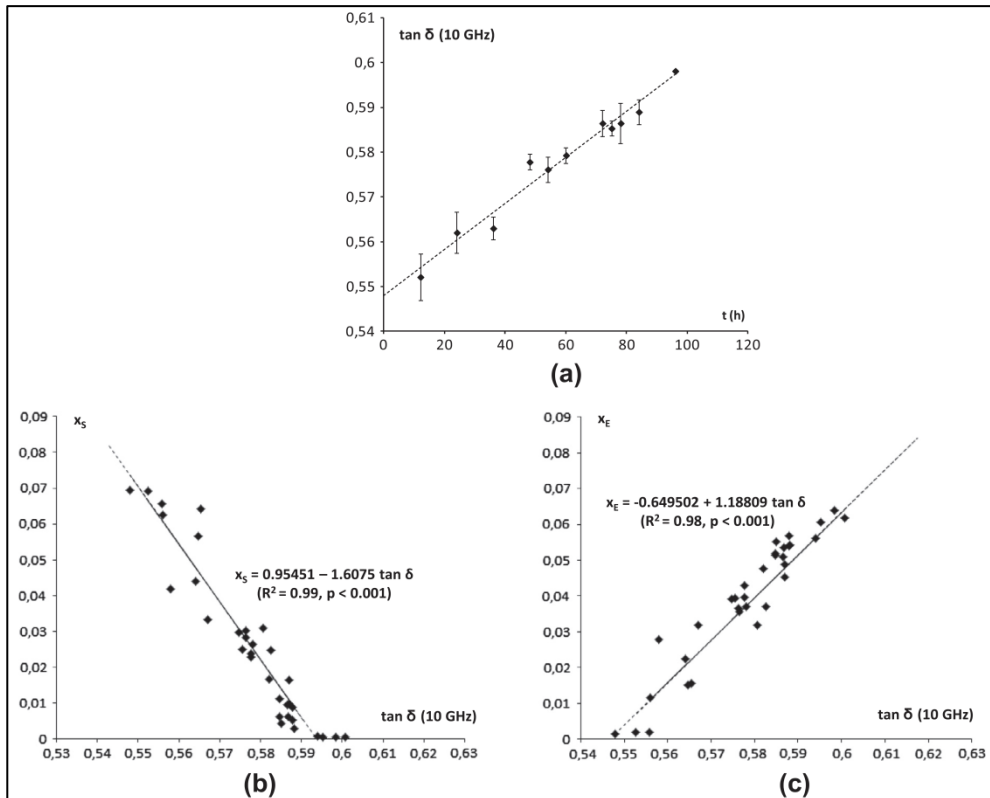


Figure 8. a) Evolution of loss tangent at 10 GHz through the beer production. b) Measured (\blacklozenge) and predicted (line) sugar content versus loss tangent at 10 GHz. c) Measured (\blacklozenge) and predicted (line) ethanol content versus loss tangent at 10 GHz.

Therefore, an ANOVA analysis shows a very significant relation between the sugar and ethanol concentrations with the loss tangent at 10 GHz, being possible to develop a factorial equation to predict ethanol and sugars evolution, during process, by using the loss tangent, as it is shown in Fig. 8. It is important to highlight that dielectric prediction works because ethanol production and sugars consumption are coupled by the

fermentation reaction; and the limits of the prediction (no ethanol production or less initial sugar content) can also be detected because if there is no ethanol production, the loss tangent at 10 GHz remains constant; on the other hand, less initial sugar content would represent low value of loss tangent at 10 GHz as it can be appreciated in the standard solutions assay.

5. Conclusions

The compositional changes during the fermentation process of the malt by yeast under anaerobic conditions can be detected by dielectric spectroscopy. Therefore, this technique can be used as a fast, accurate and non-destructive control method of beer production.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación throughout the project AGL2011-30096. Author M. Castro-Giráldez thanks the Campus de Excelencia Internacional VLC/CAMPUS for their support. Author J. Velázquez-Varela thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México for their support.

References

Adous, M., Quéffélec, P., Laguerre, L., (2006). Coaxial/cylindrical transition line for broadband permittivity measurement of civil engineering materials. *Measurement Science and Technology* 17 (8), 2241–2246.

Alves Jr., S.L., Herberts, R.A., Hollatz, C., Triche, D., Miletti, L.C., Araujo, P.S., Stambuk, B.U., 2008. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (5), 1494–1501.

Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J.L., Guillouet, S.E., 2006. Minimization of glycerol

production during the high performance fedbatch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. Applied and Environmental Microbiology 72, 2134–3140.

Bircan, C., Barringer, S.A., Mangino, M., 2001. Use of dielectric properties to detect whey protein denaturation. Journal of Microwave Power EE 36, 179–186.

Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M., Van Dijck, P., 2007. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. Applied and Environmental Microbiology 73, 815–824.

Bohigas, X., Tejada, J., 2010. Dielectric characterization of alcoholic beverages and solutions of ethanol in water under microwave radiation in the 1–20 GHz range. Food Research International 43, 1607–1613.

Brunton, N.P., Lyng, J.G., Zhang, L., Jacquier, J.C., 2006. The use of dielectric properties and other physical analyses for assessing protein denaturation in beef biceps femoris muscle during cooking from 5 to 85°C. Meat Science 72 (2), 236–244.

Castritius, S., Kron, A., Schäfer, T., Rädle, M., Harms, D., 2010. Determination of alcohol and extract concentration in beer samples using a combined method of near-infrared (NIR) spectroscopy and refractometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (24), 12634–12641.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Chenoll, C., Fito, P., 2010a. Development of a dielectric spectroscopy technique for determining key chemical components of apple maturity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (6), 3761–3766.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Chenoll, C., Fito, P., 2010b. Development of a dielectric spectroscopy technique for the

determination of apple (Granny Smith) maturity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (4), 749–754.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Fito, P., 2011a. Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling long time osmotic dehydration of parenchymatic apple tissue. *Journal of Food Engineering* 104, 227–233.

Castro-Giráldez, M., Tylewicz, U., Fito, P.J., Dalla Rosa, M., Fito, P., 2011b. Analysis of chemical and structural changes in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward) through the osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering* 102 (1), 34–42.

Cavinato, A.G., Mayes, D.M., Ge, Z., Callis, J.B., 1990. Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 62 (18), 1977–1982.

Damez, J.L., Clerjon, S., Abouelkaram, S., Lepetit, J., 2008. Beef meat electrical impedance spectroscopy and anisotropy sensing for non-invasive early assessment of meat ageing. *Journal of Food Engineering* 85, 116–122.

Datta, A.K., Anantheswaran, R.C., 2001. *Handbook of Microwave Technology for Food Applications*. Marcel Dekker, New York.

De los Reyes, R., Balbastre, J.V., Andres, A., Fito, P., De los Reyes, E., 2009. Monitoring the desalting process of cod using dielectric spectroscopy. *The Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 43 (3), 42–47.

Denny, M., 2009. *The Science of Beer*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Held, P., 2010. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Application Note. BioTek Instruments, Inc.

Iñon, F.A., Garrigues, S., De la Guardia, M., 2006. Combination of mid-and near-infrared spectroscopy for the determination of the

quality properties of beers. *Analytica Chimica Acta* 571 (2), 167–174.

Kent, M., Knökel, R., Daschner, F., Berger, U.K., 2001. Composition of foods including added water using microwave dielectric spectra. *Food Control* 12, 467–482.

Labianca, D.A., 1996. Analysis of breath alcohol via infrared spectrophotometry: predicting false ethanol results by application of the base-line method to vapor phase infrared spectra. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34, 59–61.

Labidi, M., Tahar, J.B., Choubani, F., 2011. Meta-materials applications in thin-film sensing and sensing liquids properties. *Optics Express* 19 (S4), A733–A739.

McLeod, G., Clelland, K., Tapp, H., Kemsley, E.K., Wilson, R.H., Poulter, G., Coombs, D., Hewitt, C.J., 2009. A comparison of variate pre-selection methods for use in partial least squares regression: a case study on NIR spectroscopy applied to monitoring beer fermentation. *Journal of Food Engineering* 90, 300–330.

Metaxas, A.C., Meredith, R.J., 1993. Industrial microwave heating. IEE Power Engineering Series 4. Peter Peregrinus Ltd., United Kingdom, London.

Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L., Stahl, U., 2002. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEM Yeast Research* 2, 225–232.

Nogueira, L.C., Silva, F., Ferreira, I., Trugo, L.C., 2005. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* 1065, 207–210.

OIV, 2004. Organisation Internationale de la Vigne et du vin. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts. OIV, Paris.

Olmi, R., Meriakri, V.V., Ignesti, A., Priori, S., Riminesi, C., 2007. Dielectric spectroscopy of sugar and ethanol solutions in water for monitoring alcoholic fermentation processes. *Journal Microwave Power Electromagnetic Energy* 41 (3), 37–49.

Panteloglou, A.G., Box, W., Smart, K., Cook, D.J., 2010. Optimization of a small-scale fermentation test to predict the premature yeast flocculation potential of malts. *The Journal of the Institute of Brewing and Distilling* 116 (4), 413–420.

Piddocke, M.P., Kreisz, S., Heldt-Hansen, H.P., Nielsen, K.F., Olsson, L., 2009. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (3), 453–464.

Preedy, V.R., 2009. Beer composition and properties. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, London, pp. 211–367.

Sato, T., Buchner, R., 2004. Dielectric relaxation processes in ethanol/water mixtures. *Journal of Physical Chemistry* 108, 5007–5015.

Shiinoki, Y., Motouri, Y., Ito, K., 1998. On-line monitoring of moisture and salt contents by the microwave transmission method in a continuous salted butter-making process. *Journal of Food Engineering* 38, 153–167.

Smith, G., Duuffy, A.P., Shen, J., Oliff, C.J., 1995. Dielectric relaxation spectroscopy and some applications in the pharmaceutical sciences. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (9), 1029–1044.

Šmogrovicová, D., Dömén, Z., 1999. Beer volatile by-product

formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Process Biochemistry* 34 (8), 785–794.

Tang, J., 2005. Dielectric properties of foods. In: Schubert, H. (Ed.), *Microwave Processing of Foods*. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, GBR, pp. 22–33.

Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D., Stassi, P., 1999. Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnology Progress* 15, 105–111.

Treo, E.F., Felice, C.J., 2009. Non-linear dielectric spectroscopy of microbiological suspensions. *Biomedical Engineering Online* 8 (19), 1475-925X.

Wang, Y., Wig, T.D., Tang, J., Halberg, L.M., 2003. Dielectric properties of foods relevant to RF and microwave pasteurization and sterilization. *Journal of Food Engineering* 57 (3), 257–268.

Wojnarowska, Z., Hawelek, L., Paluch, M., Sawicki, W., Ngai, K.L., 2011. Molecular dynamics at ambient and elevated pressure of the amorphous pharmaceutical: nonivamide (pelargonic acid vanillylamide). *Journal of Chemical Physics* 134, 1–7.

Zengran, L., Guangyi, Z., Yunping, S., 2008. Mutagenizing brewing yeast strain for improving fermentation property of beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106 (1), 33–38.

Parte 3

En esta parte de la tesis doctoral se describe los resultados obtenidos que corresponde con el tercer objetivo particular, dando lugar a la publicación;

4.3 Thermodynamic analysis of salting cheese process

Artículo publicado en:

Journal of Food Engineering

Vol. 130 (2014) 36-44

El proceso de elaboración de queso conlleva la concentración de caseína y grasa, principalmente, donde intervienen varias etapas y diversas transformaciones bioquímicas, influyendo sobre el rendimiento, la composición y calidad del queso. En consecuencia, el análisis del proceso de fabricación de un queso resulta complejo y difícil de explicar de forma sencilla. Por todo ello, es necesario analizar de manera adecuada las diferentes transformaciones físicas y químicas y conocer los factores que influyen en estas, para poder explicar el proceso de fabricación del queso con base a principios científicos. Una forma de explicar tales fenómenos complejos es mediante el uso de la termodinámica, desarrollando modelos que describan los fenómenos que se producen en la fabricación de alimentos con estructura compleja.

La importancia de analizar los fenómenos, radica en controlar el proceso de elaboración de productos de forma segura y eficiente. Por ende, el desarrollo y la aplicación de los análisis termodinámicos, contribuye a obtener resultados predictivos, optimizando y maximizando los recursos.

Journal of Food Engineering 130 (2014) 36-44

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng

Thermodynamic analysis of salting cheese process

J. Velázquez-Varela, P.J. Fito, M. Castro-Giráldez*

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo,
Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia,
Spain.

Keywords:

Cheese

Salting process

Nonlinear irreversible thermodynamic model.

ABSTRACT

The manufacture of cheese is a complex process which involves several phases and biochemical transformations. All these variables have important influence over the performance, composition and quality of cheese. Therefore, the optimization of the manufacturing process of this product is difficult. Salting process involves complex phenomena which are hardly to explain, and one of its main problems is the difficulty to control de simultaneous water and salt fluxes into the product and to control the proteins transformations throughout process. Water and salt transport during osmotic treatment of cheese in saturated brine, were investigated by using a thermodynamic approach. Moisture, water activity, dielectric properties and volume were measured in treated and reposed samples. A nonlinear irreversible thermodynamic model has been developed to determine the transport of water and ions through the structure of cheese, obtaining a phenomenological coefficient of $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ J}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. This model describes various phenomena that occur in salting cheese process, including the different driving forces.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved

*Corresponding author. Tel.: +34 963879832.

E-mail address: marcasgi@upv.es (M. Castro-Giráldez)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.017> 0260-8774/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cheese is a colloidal system formed by three phases (protein, fat and aqueous) in electrical equilibrium (gel conformation). Therefore, the analysis of microstructure in cheese could be necessary to understand the mechanisms involved during salting process (Aguilera and Stanley, 1999; Fito et al., 2007).

Salting treatment is one operation commonly used in dairy industry to preserve and to conform the final quality of cheese. In osmotic treatments, native and added chemical compounds fluxes are produced by chemical potential gradients (Castro-Giráldez et al., 2010a). The flux of solutes among the heterogeneous phases of the cheese matrix has been reported for salting cheese processes. This process has been frequently described by the second Fick's law in terms of effective diffusion coefficient; Floury et al., (2009) obtained an effective diffusion coefficient of $2.81\text{-}3.43\cdot 10^{-10}$ m^2s^{-1} for model cheese systems.

Baroni et al., (2003), studied this process for Prato cheese, obtaining a value for effective diffusion coefficient of $1.64 - 4.25\cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Turhan et al., (1999), studied white cheese, obtaining a value for effective diffusion coefficient of $2.1\text{-}3.4\cdot 10^{-10}$ m^2s^{-1} ; Guinee and Fox (2004), studied Romano cheese, obtaining a value for effective diffusion coefficient of $2.54\text{-}3.35\cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; Luna and Bressan (1986), studied Cuartirolo Argentino cheese, and the value of effective diffusion coefficient was $3.6\cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Yanniotis et al., (1983), for feta cheese, the value of effective diffusion coefficient was $2.3\cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Hardy (1976), studied Camembert cheese and the value of effective diffusion coefficient was $2.54\cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. These estimates were obtained with Fick's model, applying the simplifications of this model. These simplifications allow its use only in systems with ideal conditions, without changing the state variables. For this reason the values obtained are different in each experimental.

However, there are different mechanisms involved during the mass transfer of solutes and it is difficult to establish an individual effect of each component due to the existence of strong interactions between them (Castro-Giráldez et al., 2010a; Fito et al., 2007; Even though the salting treatment is not a novel operation, the mass transport phenomena involved are not yet fully understood. Usually the models oversimplify the food system (Fito et al., 2008), which is supposed to be isotropous, homogeneous and continuous, with few components and phases (Crank, 1985). The thermodynamic has the capability to identify pathways of various processes, providing data of the mechanisms that are involved. Various new approaches in thermodynamics have been developed to understand the transport phenomena in systems. The theory of non-equilibrium thermodynamics are based on the irreversible character of fluxes and forces of an open system, and describe the transports in the processes coupled with chemical reactions (Demirel, 2002).

The objective of this work was to describe the salting cheese process by using a thermodynamic approach, taking into account the structure of cheese matrix in water and salt transport phenomena.

2. Material and methods

2.1 Raw material

18 cheeses were proportionated by FORMATGERIA GRANJA RINYA S.L. factory (Valencia, Spain). All the cheeses were fresh Tronchon type, they were conducted under the same pressing conditions and with identical compositional characteristics. The cheeses were provided unsalted and just after the pressing operation. Samples were obtained from the center of each cheese. Brine was prepared with sodium chloride (PRS-codex, Panreac® Química SA, Barcelona, Spain) and distilled water.

2.2 Salting Operation

Experimental flowchart is shown in figure 1, where it is possible to observe the salting treatment conditions using 25% (w/w) sodium chloride brine at 4°C. 72 cheese cylinders (30 mm diameter and 10 mm thick) were cut. Samples were immersed in a vessel containing the osmotic solution with continuous stirring, for 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 900 and 1440 min; later they were equilibrated in an isothermal chamber at 4°C for 24 hours.

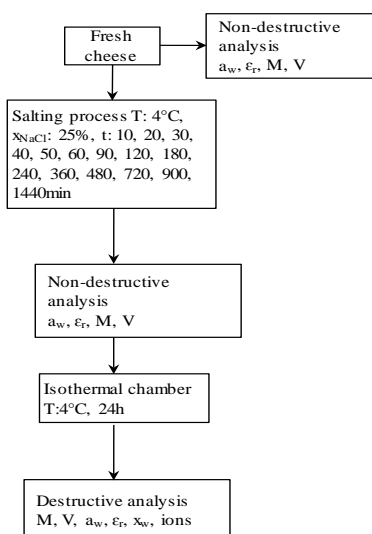


Figure 1. Diagram of the experimental procedure.

Mass was determined by using a Mettler Toledo Balance (± 0.0001) (Mettler-Toledo, Inc., USA). The surface water activity was determined by a dew point hygrometer Decagon (Aqualab® series 3TE) with precision $\pm 0,003$. Also the water activity of the solution (brine) was measured at each osmotic time. Measurements were done in structured samples (not minced), thus a_w obtained is considered to be surface a_w . Water content was determined by AOAC Method 934.06 (2000). The volume was determined by image analysis (Canon® Power Shot SX210 IS), using Adobe Photoshop® software (Adobe Systems Inc., San Jose,

CA, USA) in order to get the diameter and the thickness of the samples. Ion and cation content was carried out by means of an ion chromatograph (Methrom Ion Analysis, Herisau, Switzerland), using an universal standard column (Metrosep C2–150, 4.0 x 150 mm) along with an eluent composed of tartaric acid (4.0 mmol/L) and dipicolinic acid (0.75 mmol/L), equipped with electronic detectors. In every case, the cheese samples were previously homogenized at 4200 rpm in an Ultraturrax T25 for 5 min and centrifuged (J.P. Selecta S.A., Medifriger-BL, Barcelona, Spain) at 8000 rpm for 20 min at 4°C. Afterwards, 1mL of supernatant was diluted with Milli®-Q water in a 250 mL Erlenmeyer flask. The clarified extract was filtered through a 0.45 µm Millipore filter; 15 mL was used to analyze the anion content. Measurements were taken in duplicate.

Representative fresh samples and reposed samples were used to obtain images of the microstructure by Cryo-SEM.

2.3 Dielectric properties measurement

Dielectric properties were measured by using an Agilent 85070E Open-ended coaxial probe connected to an Agilent E8362B vector network analyzer. The software of the network analyzer calculates the dielectric constant and loss factor as a reflected signal function. The system was calibrated by using three different types of loads: open circuit (air), short-circuit and 25°C distilled water. Once the calibration was made, 25°C distilled water was measured again to check calibration suitability.

The dielectric properties were measured by attaching the probe to the surface of the samples at 25°C from 500 MHz to 20 GHz. The mean values of at least three replicates of the cheese samples are reported in this article.

2.4 Low temperature scanning electron microscopy (Cryo-SEM).

A Cryostage CT-1500C unit (Oxford Instruments, Witney, UK), coupled to a Jeol JSM-5410 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan), was used. The sample was immersed in slush N_2 ($-210^\circ C$) and then quickly transferred to the Cryostage at 1 kPa, where sample fracture took place. The sublimation (etching) was carried out at $-95^\circ C$; the final point was determined by direct observation in the microscope, working at 5 kV. Then, once again in the Cryostage unit, the sample was coated with gold in vacuum (0.2 kPa), applied for 3 min, with an ionization current of 2 mA. The observation in the scanning electron microscope was carried out at 15 kV, at a working distance of 15mm and a temperature $\leq 130^\circ C$.

3. Results and discussion

Cheese samples were analyzed after the salting treatment, where the samples show concentration profiles, being non-equilibrated. After 24 hours of repose, samples reached the equilibrium and the measurements were repeated.

Salting operation produces mass transfer phenomena (Castro-Giráldez et al., 2010a), and the behaviours involved in that transfer are complex. In order to determine the transport of the major chemical compounds involved in this complex process, as a first step to understand those phenomena, mass variation can be used:

$$\Delta M^j = \frac{M^t - M^0}{M^0} \quad (1)$$

$$\Delta M_i^j = \frac{M^t \cdot x_i^t - M^0 \cdot x_i^0}{M^0} \quad (2)$$

Where M represents the mass (kg), x is the mass fraction (kg/kg), the superscript t is the treatment time and 0 is the initial time, the superscript j could be $0h$ or $24h$ and represent the non-equilibrated samples or the equilibrated samples, respectively.

Figure 2a shows that the largest loss of mass occurs during the first 200 minutes of treatment. From that salting time, the loss of mass is less pronounced. This mass lost is explained mainly by the dehydration suffered by the sample during treatment (Figure 2b), since both figures show similar trends especially during the early stages of treatment. The curves show differences that can be attributed to the movement of other chemical species and other driving forces of transport such as mechanical or electrical.

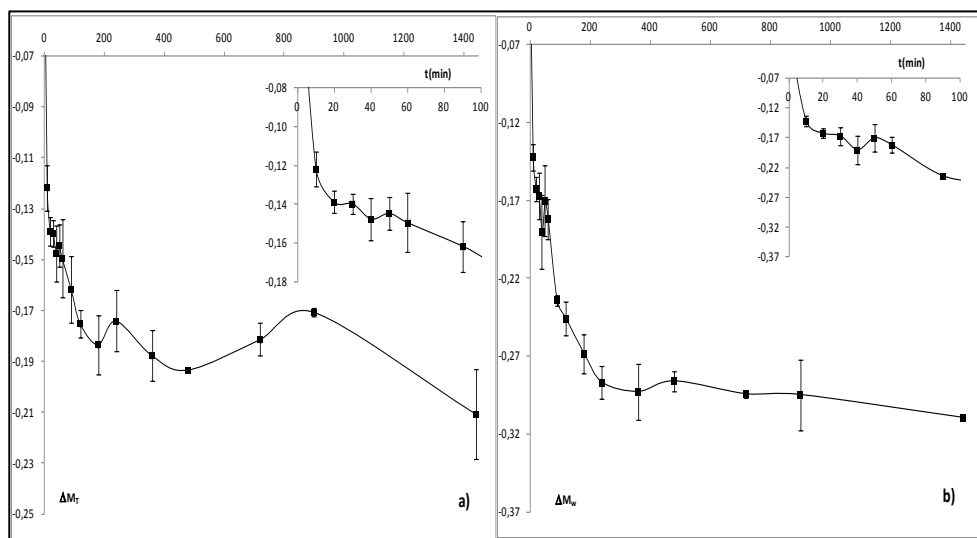


Figure 2.a) Overall mass variation during the salting treatment (non-equilibrated samples). b) Water mass variation during the salting treatment (non-equilibrated samples).

Figure 3a shows the mass variations of sodium and chloride ions during the treatment. Massive inflows of these ions from the solution into the interior of the sample can be observed caused by high activity gradients. This gain occurs mainly during the early stages of treatment.

In Figure 3b, the mass variation of Ca^{+2} during the salting treatment is represented. This figure represents the release of calcium from the protein structure of the cheese into its liquid phase during the salting process. This release presents a maximum at 120 minutes of treatment. The calcium released into the cheese liquid phase will move to the osmotic solution, driven

by high activity gradients, because there is no calcium in the solution. Therefore, both mechanisms (the release of calcium and the calcium transport) are coupled.

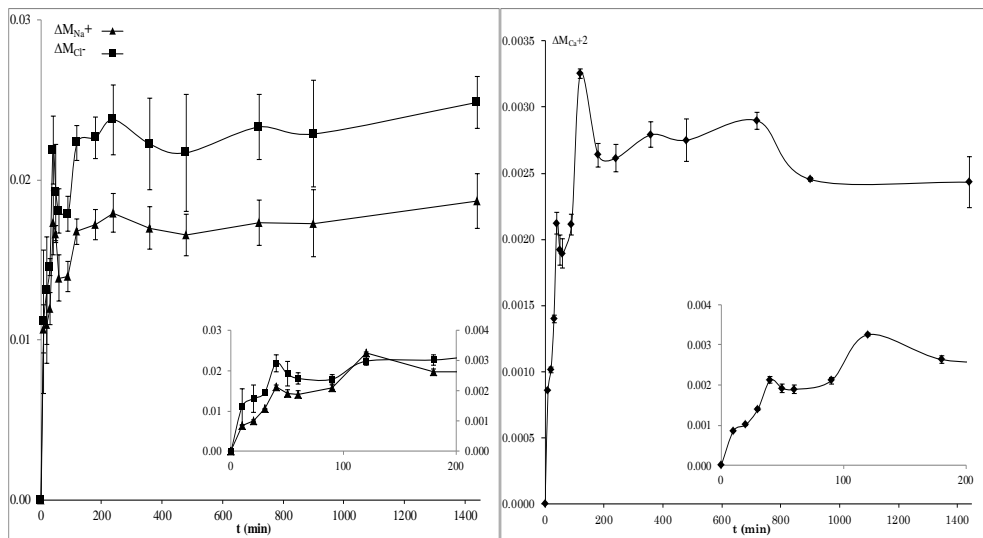


Figure 3. a) Mass variation of sodium and chloride ions during the salting treatment (non-equilibrated samples). b) Mass variation of calcium cation during the salting treatment (non-equilibrated samples).

In cheese, there are multiple dynamic equilibriums between caseins with different forms of calcium and phosphate in the micelles and in the solution. The micelles can change considerably due to changes in the environment that can drag little caseins and ionic calcium into the solution. Some authors have shown that the salt used in cheese manufacture is probably responsible of the calcium ion release to the cheese liquid phase by a sodium-calcium exchange in protein structure (Guinee and Fox, 1986; 2004).

The variation of volume during the salting treatment (Figure 4) was also studied (Equation 3).

$$\Delta V^j = \frac{v^t - v^0}{v^0} \quad (3)$$

Where V represents the volume (m^3), the superscript t is the treatment time and 0 is the initial time, the superscript j could be $0h$ or $24h$ and represent the non-equilibrated samples or the equilibrated samples, respectively.

In the figure 4, it is possible to observe that the loss of volume is not exactly coupled to the mass changes of the samples, being the mechanical energies relevant, especially at short times in which there are marked fluctuations in the volume (non-significant). Water and ions fluxes can be understood as compression and relaxation phenomena. The different flows promoted in osmotic treatment can be calculated by mass variation, the processing time and samples surface (equations 4 and 5).

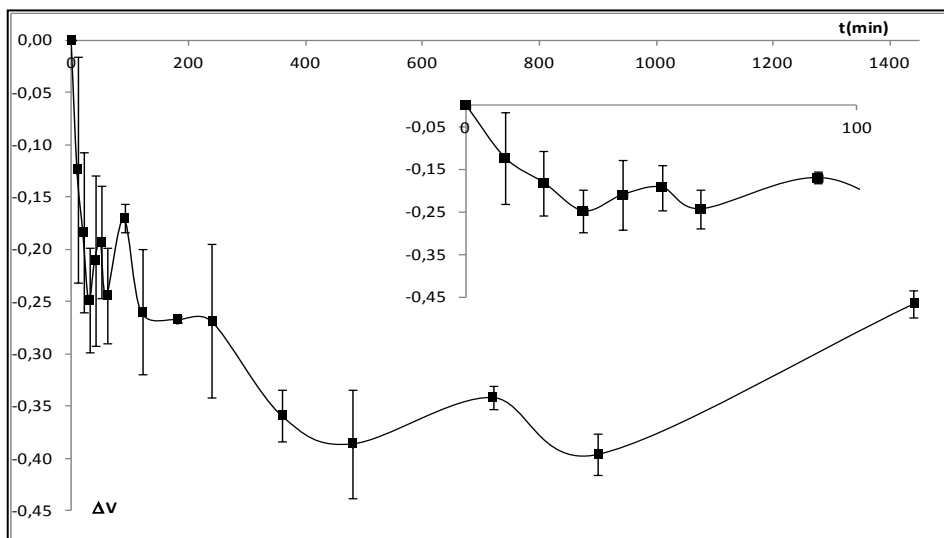


Figure 4. Volume variation during the salting treatment (non-equilibrated samples).

$$J_w^{0h} = \frac{-\Delta M_w^{0h} \cdot M_0}{\Delta t \cdot S \cdot Mr_w} \quad (4)$$

$$J_i^{0h} = \frac{-\Delta M_i^{0h} \cdot M_0}{\Delta t \cdot S \cdot Mr_i} \quad (5)$$

Where, J represents the molar flux ($\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), Δt is the processing time (s), S is the surface measured during treatment

(m^2), M_r is the molecular weight of water, chloride, sodium and calcium, subscripts i and w represent ions and water, respectively.

In figures 5 (a, b, c and d), the molar fluxes of water and ions are shown; these fluxes are promoted by changes of chemical potentials (Castro-Giráldez et al., 2010b).

When cheese is placed in brine, there is a movement of sodium and chloride molecules from the solution into the cheese, and simultaneously an outflow of water and calcium from the cheese to the solution, promoted by the gradients of chemical potentials (figures 5a, b, c and d).

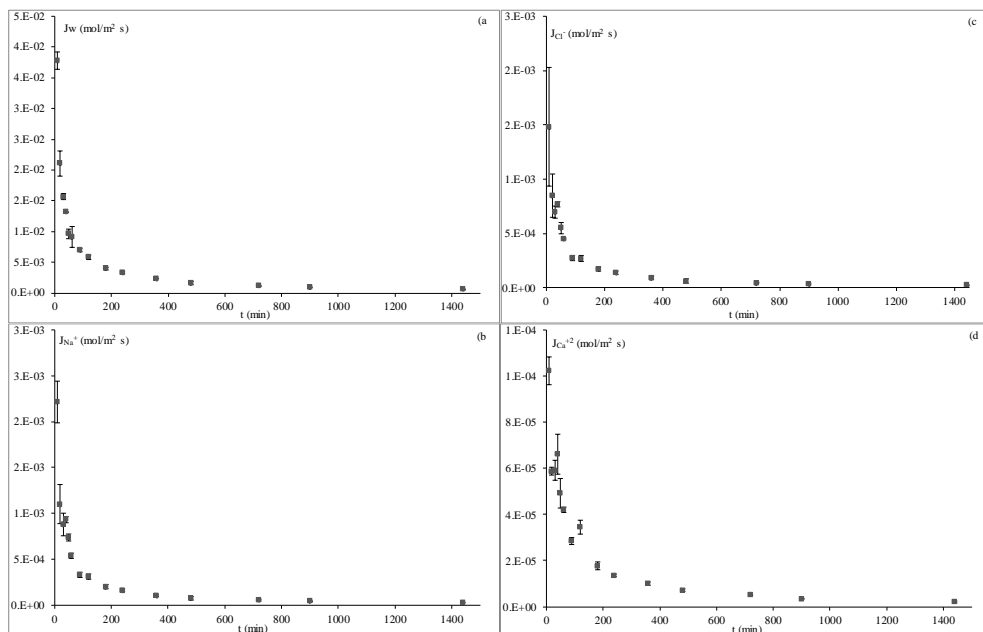


Figure 5. a) Water, b) Sodium, c) Chloride and d) Calcium fluxes during the salting treatment (non-equilibrated samples).

In figure 6, it is represented a surface property (surface water activity) with regard to an average measurement of the system (moisture in dry basis). Both measurements were studied just after the treatment and after the repose time (24 hours). It is possible to observe an increase in the surface water activity caused by the internal fluxes that occur in cheese during the

repose time. With the equilibrated data, it is possible to estimate the surface moisture in treated samples (non-equilibrated samples).

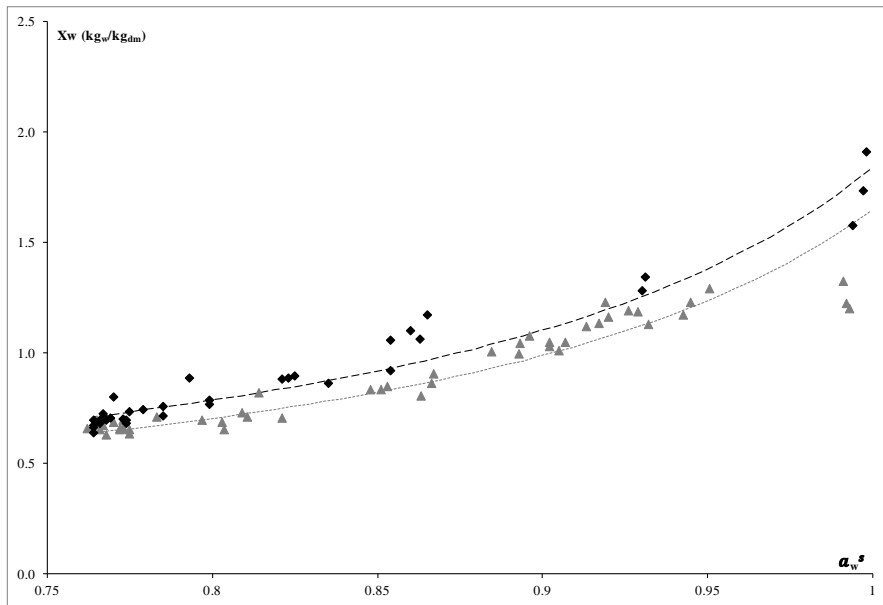


Figure 6. Relationship between the moisture in dry basis and the surface water activity for treated samples (◆) and reposed 24 h (▲). Where (—) correspond to the estimation of GAB model for the treatment samples and (---) for equilibrated samples.

Figure 7 numbers 1 and 2 show the structure of fresh cheese; it is possible to appreciate the protein matrix of caseins with cavities containing fat globules and liquid phase, the numbers 3 and 4 show that the pores between caseins were becoming smaller with the salting treatment. With the salting, the water is going out and the caseins begin to aggregate. The protein network seems to become more continuous and compact; the ions chloride and sodium go inside the cheese, having a great impact in the protein matrix and in the fat globules. The addition of salt increases the ionic strength and decreases the pKa of proteins, modifying also the surface free energy (surface tension) of the fat globules (Lopez et al, 2007).

In the number 5, it is possible to appreciate fat globules which are inside the protein network already compacted with no pores. The

amount of salt affects the amount of dispersed fat (fat globules) contained in the cheese (Everett et al, 2004). Finally the number 6, shows the network of protein fully compacted in a continuous system.

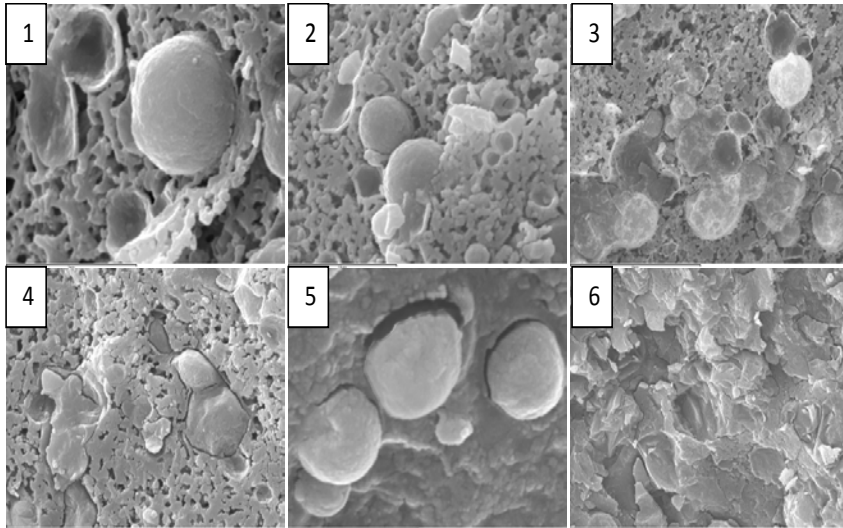


Figure 7. Cryo-SEM pictures of cheese samples at different treatment times; where 1 and 2 correspond to fresh cheese, at 1000x and 5000x, respectively; 3 and 4 treated samples at 20 minutes; at 5000x; 5 and 6 treated samples at 1440 min, at 1000x and 5000x respectively.

The behaviour of ions in the food liquid phase is mainly influenced by two factors: the attraction between ions of opposite charge and the repulsion between ions of the same sign (Coulomb's law), and the influence of thermal agitation (Boltzmann distribution law) to counteract the electric attractions and repulsions. These effects depend on the total ionic composition of the food liquid phase which can be expressed by its ionic strength, I (mol L^{-1}):

$$I = \frac{1}{2} \sum [c_i \cdot z_i^2] \quad (6)$$

where c is ionic molar concentration (mol L^{-1}) and z is the valence, subindex i represents the electrolytic chemical specie.

The activity coefficient, γ (dimensionless), can be estimated from the extended Debye-Hückel law for heterogeneous system (Atkins & De Paula, 2006):

$$\text{Log}\gamma = -|z|^2 A \cdot \left(\frac{I^{1/2}}{1+aB \cdot I^{1/2}} + b \cdot I \right) \quad (7)$$

where: A, B, a, b are empirical adjustable parameters which values can be observed in table 1 (Langmuir, 1997).

Table 1. Extended Debye-Hückel parameters used in the calculations (Langmuir, 1997).

			Chloride	Sodium	Calcium
A	0,5083	a	3,5·10 ⁻⁸	4·10 ⁻⁸	5·10 ⁻⁸
B	0,3287	b	0,015	0,075	0,165

The activity of each chemical species can be obtained by using the equation 8:

$$a_i = c_i \cdot \gamma_i \quad (8)$$

Non-linear thermodynamic approach

A non-linear thermodynamic model has been developed for describing the cheese salting process (Figure 8). In order to understand and to estimate the molecular transport through the interface, it is necessary to determine the free energy variation across the interface per mol of any chemical specie in motion. Gibbs free energy variation has been determined by equation 9 (Demirel, 2002):

$$dG = -SdT + VdP + Fdl + \psi de + \sum_i \mu_i dn_i \quad (9)$$

Where: SdT corresponds to the thermic term and it is directly related to heat fluxes, VdP and Fdl are the mechanical energies related to the structural changes; where VdP corresponds to pressure variation and Fdl to the elongation force, finally ψde represents the effect of the electric field induced by solved ions.

The term $\sum_i \mu_i dn_i$ is the addition of the chemical potentials of all the compounds in the system considering P, T and the molar concentration of the rest of the compounds, constant.

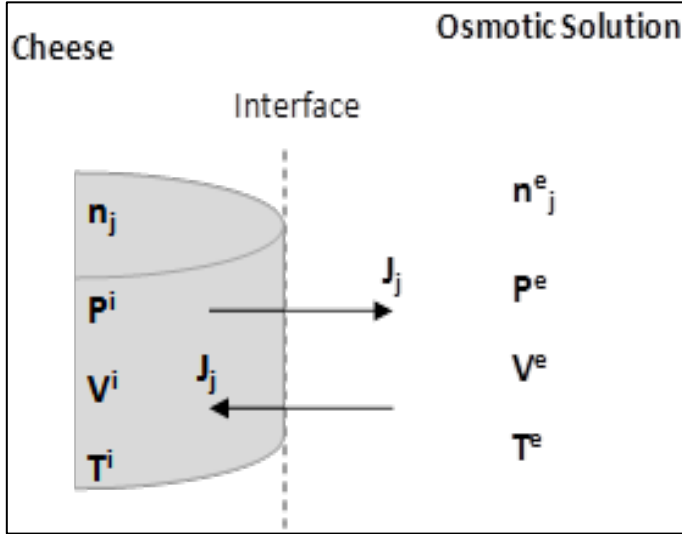


Figure 8. Scheme representing the interface between cheese and osmotic solution.

The system is isotherm, then the entropic term can be neglected.

$$dG = VdP + Fdl + \psi de + \sum_i \mu_i dn_i \tag{10}$$

Because salted cheese is an electrolytic system, it is necessary to establish the electric effect in order to calculate the free energy. Therefore, the charge variation of the electric term (de) can be written as follows:

$$de = \sum z_i \cdot F \cdot dn_i \tag{11}$$

where, z_i is the valence of each electrolyte (with sign), F is the Faraday constant ($96485.3415 \text{ C mol}^{-1}$) and n_i is the variation of each ion. In general, when a transport of ionic species with the same valence is produced, the charges cancel the electric field generated and this term is 0. In the case of cheese salting, the release of calcium ions causes the inclusion of new charges to the

medium which produce disequilibrium of the system, causing an electric field intensity associated to the ions movement. A recent study showed that the addition of calcium to the osmotic solution, at the same concentration of native ionic calcium, reduces the calcium losses and decreases the water and sodium transport (Luo et al., 2012). This occurs because it changes the calcium chemical potential and reduces the effect of calcium in the electric field.

The variation of electric potential (Ψ) can be calculated from the electric field intensity (E) generated by the flow of ions to the medium (Equation 12):

$$E = -\nabla\psi \quad (12)$$

The electric field can be associated with the current charges intensity and the ionic conductivity of the medium (Ohm's law). Thus, the current intensity of an electrolytic solution for an isothermal system can be defined as follows (Equation 13):

$$I = \sigma \cdot E \quad (13)$$

Where I is the current intensity ($C \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), σ is the electric conductivity ($S \text{ m}^{-1}$) and E is the electric field generated by the charges ($V \text{ m}^{-1}$).

The current intensity for an electrolytic system can be described by the next equation (Equation 14):

$$I = \sum_{i=j} z_i \cdot F \cdot J_i \quad (14)$$

This equation applied to the cheese system can be written as follows:

$$I = F \cdot (-1J_{Cl} + 1J_{Na} + 2J_{Ca}) \quad (15)$$

Ionic conductivity can be obtained from the loss factor at 500 MHz, because at this frequency the ionic conductivity is the major contribution to the loss factor (Castro-Giráldez et al, 2010b):

$$\sigma = \varepsilon'' \cdot \varepsilon_0 \cdot \omega = \varepsilon'' \cdot \varepsilon_0 \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \quad (16)$$

where: ε'' is the loss factor (dimensionless), ε_0 is the vacuum permittivity, $8.854 \cdot 10^{-12}$ (F m⁻¹); ω angular velocity (rad s⁻¹), f frequency (Hz).

Therefore, with equation 13, it is possible to estimate the electric field produced by the ions flow. Figure 9 shows the evolution of electric field throughout the process time. This electric field is produced by an imbalance between the anions and cations in liquid medium. The responsible of the imbalance in charge is calcium ion, liberated from the protein matrix.

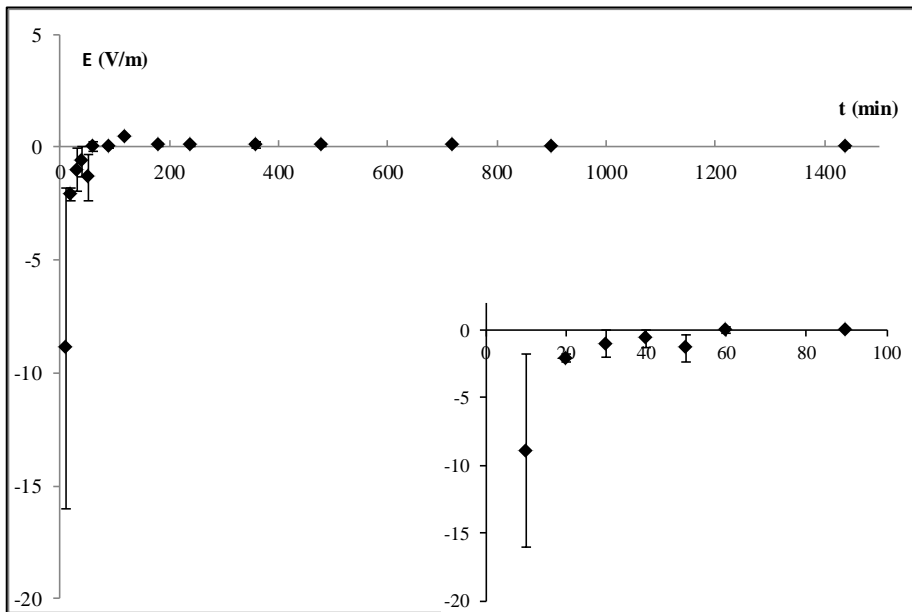


Figure 9. Evolution of electric field throughout the process time.

Equation 10, developed specifically per mole of chemical specie in motion, can be expressed as follows:

$$\Delta G = V\Delta P + F\Delta l + \sum_j z_j \cdot F \cdot E \cdot \Delta n_j + \sum_j RT \ln \left(\frac{a_j^x}{a_j^{x+dx}} \right) \Delta n_j \quad (17)$$

Applying the variation of free energy to the interface between the osmotic solution and the cheese surface, the following equation is obtained:

$$\Delta G = V\Delta P + F\Delta l + \sum_j z_j \cdot F \cdot E \cdot \Delta n_j + \sum_j RT \ln \left(\frac{a_j^{\text{ext}}}{a_j^{\text{int}}} \right) \Delta n_j \quad (18)$$

Being i the electrolytic species and j all the chemical species.

Considering that the mol variation can be obtained from the fluxes, from the average surface area between the initial and the final surfaces and from the time, it can be written as follows:

$$\Delta n_j = J_j \cdot \bar{S} \cdot \Delta t \quad (19)$$

Applying equation 18 without the mechanical energy terms, it is obtained a partial free energy term (Equation 20):

$$\Delta \tilde{G} = \sum_i z_i \cdot F \cdot E \cdot \Delta n_i + \sum_j RT \ln \left(\frac{a_j^{\text{ext}}}{a_j^{\text{int}}} \right) \Delta n_j \quad (20)$$

The evolution of the partial free energy during the treatment can be observed in figure 10.

In order to understand the evolution of partial free energy (Figure 10) it is necessary to comeback to figure 3 (ions mass variation), where it is possible to observe a short stage of decrease (around 60 min) inside the general trend of increase. In figure 10, a minimum peak of the partial free energy can be appreciated at 60 minutes, coinciding with the minimum peak mentioned before in figure 3. Therefore, in the ions transport, the terms of activity are the main driving forces in the first minutes of the treatment.

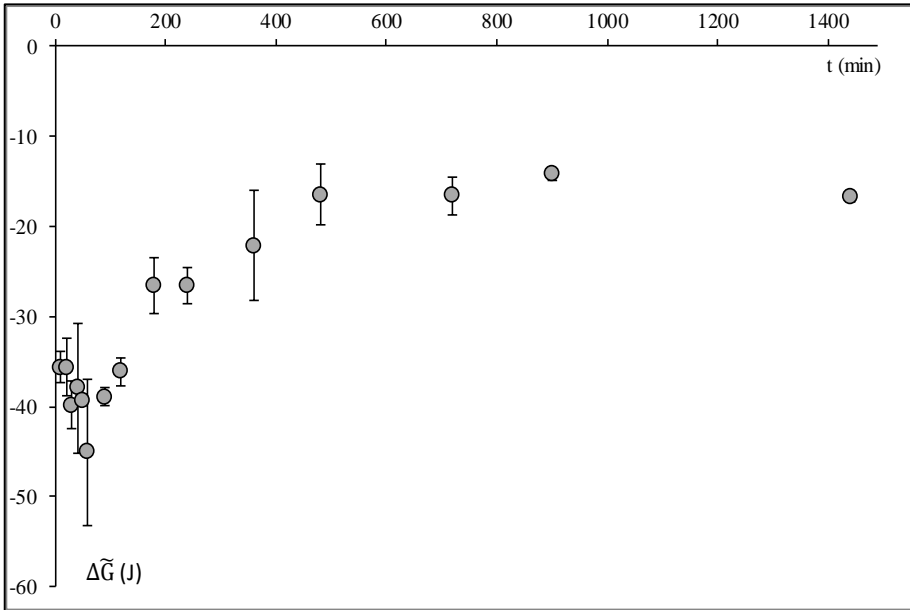


Figure 10. The evolution of the partial free energy (without mechanical terms) during the treatment.

Thus, it is possible to calculate the chemical potentials of the different chemical species at constant pressure (excluding mechanical terms) (see Equation 21).

$$\tilde{\mu}_j = \frac{\Delta\tilde{G}}{\Delta n_j} \quad (21)$$

Applying the first relation of Onsager (Demirel, 2002; Gekas, 2001) (Equation 22), the fluxes can be related with the engine of transport by a constant called phenomenological coefficient. Figure 11 shows the relation between the water fluxes with the chemical potential (without the mechanical terms).

$$\mathbf{J}_w = \mathbf{L}_w \cdot \Delta\tilde{\mu}_w \quad (22)$$

In the figure, two tendencies can be observed: at the beginning of the treatment, the mechanical terms can not be neglected because cheese undergoes a compression process in the operation prior to

mold, which causes an accumulation of mechanical energy that will be released during the salting process.

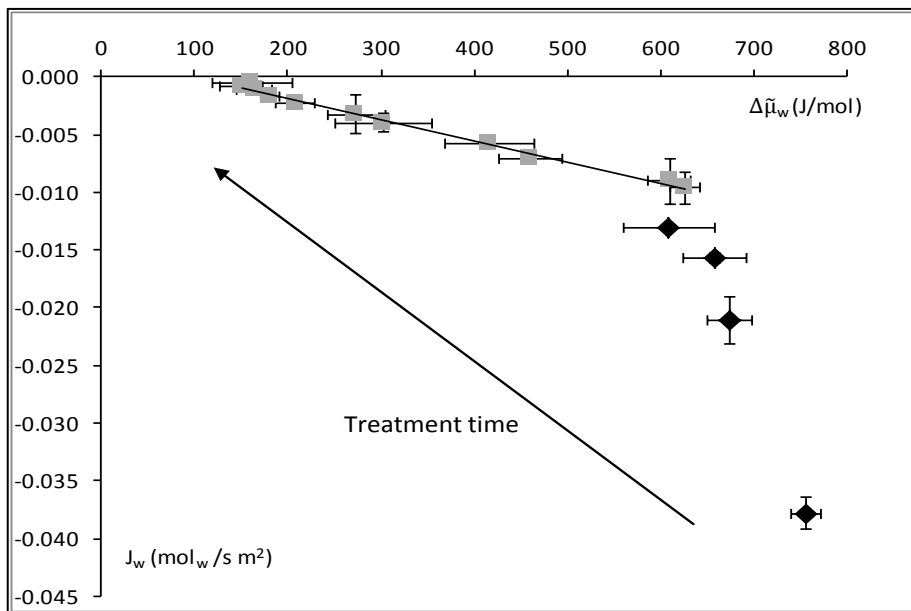


Figure 11. Variation of the water chemical potential (without mechanical terms) with regard to water flux, where (◆) corresponds to the samples affected by mechanical terms of the chemical potential, (■) corresponds to the samples with negligible mechanical terms of the chemical potential.

From 120 min to 1440 min, mechanical terms can be negligible and, applying the Onsager relation, the phenomenological coefficient of water during salting is $1,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ J}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ($R^2 = 0.9925$).

Applying the phenomenological coefficient obtained to the whole salting treatment, it is possible to calculate the water chemical potential and the free energy of the process (Equations 23 and 24).

$$\Delta\mu_w = \frac{J_w}{L_w} \quad (23)$$

$$\Delta G = \mu_w \cdot \Delta n_w \quad (24)$$

Figure 12 shows the evolution of the free energy during the salting treatment.

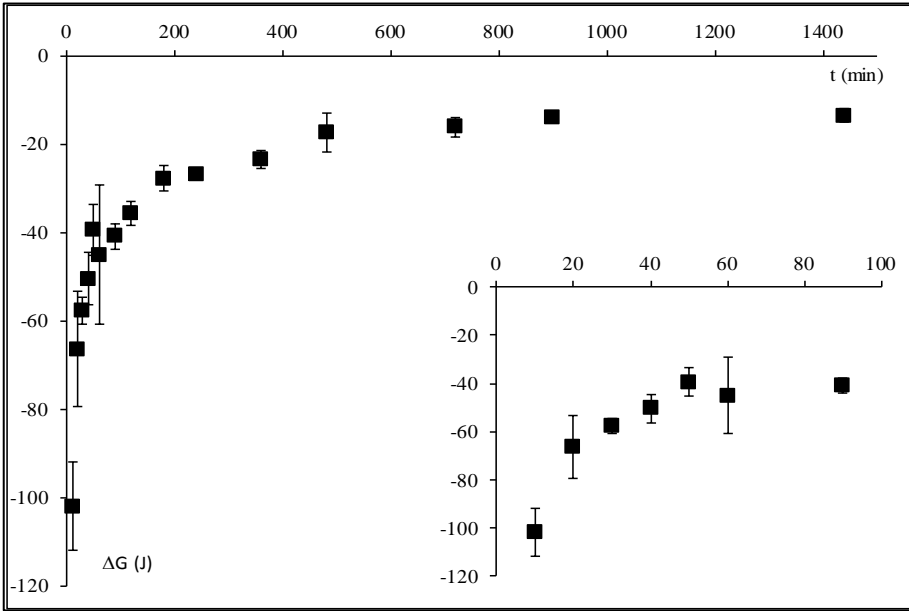


Figure 12. Evolution of the free energy during the salting treatment.

Mechanical terms can be obtained from equation 25.

$$V\Delta P + F\Delta l = \Delta G - \Delta\tilde{G} \quad (25)$$

Figure 13 shows the evolution of the mechanical terms during the salting treatment.

Figure 13 shows strong variations of the mechanical terms promoted by the mechanical energy stored during the prior operation of molded pressing. Therefore, it can be considered that the mechanical energy stored is returned in changes of the internal absolute pressure. Taking into account that the external pressure is the atmospheric, and that the mechanical terms obtained are negative, this means that subatmospheric pressures occur inside the cheese, favouring the rapid entry of external ions into the interior of cheese.

From equation 26, the chemical potential of the different chemical species can be calculated.

$$\mu_j = \frac{\Delta G}{\Delta n_j} \quad (26)$$

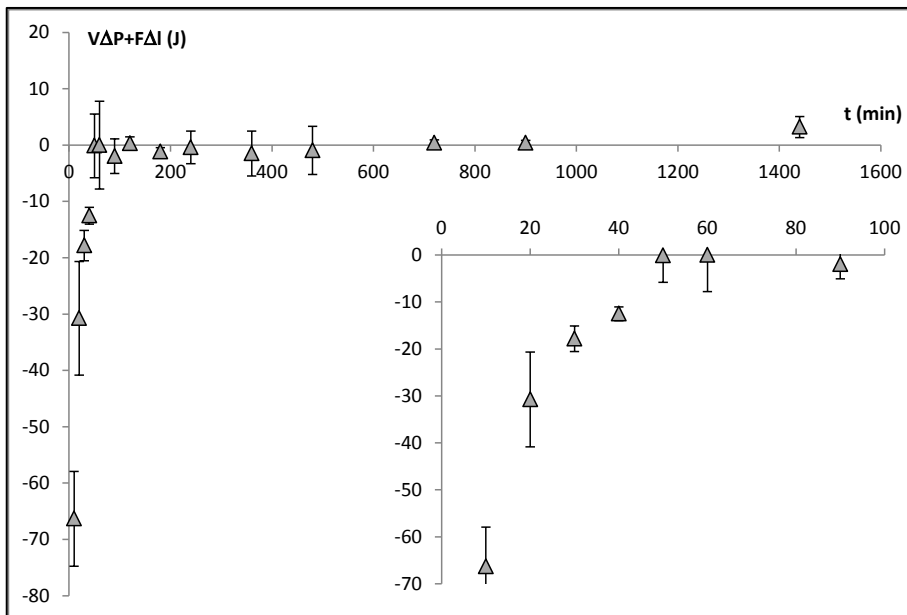


Figure 13. Evolution of the mechanical terms of the free energy during the salting treatment.

Figures 14 and 15 show the relation between the chemical potential and the fluxes of the different species in motion during the salting treatment. Applying the Onsager relation, the phenomenological coefficients of the different species can be calculated (Table 2).

Table 2. Phenomenological coefficients, the initial chemical potential and squared correlation coefficients for each ion involved in transport.

	Chloride	Sodium	Calcium
$L_i \frac{mol^2}{J \cdot s \cdot m^2}$	$4,3 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-8}$	$3,4 \cdot 10^{-10}$
$\mu_i^0 \left(\frac{J}{mol} \right)$	$1,08 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-4}$	$8,66 \cdot 10^{-6}$
R^2	0,9119	0,9055	0,9435

Table 2 shows that the ionic species show lower phenomenological coefficients than water, it is explained by the high interaction of electrolytic compounds with the charges of casein net, compared with water. The calcium ions show the lowest phenomenological coefficient, because the calcium flux depends on the calcium release by exchanging sodium in its position in the casein network. In this sense, sodium cation has an interaction with the protein matrix displacing the calcium, and producing an accumulation of sodium in the solid structure. For this reason the phenomenological coefficient of sodium (table 2), which describes the interaction between the liquid compounds in motion with the solid structure, is bigger than that of the chloride. On the other hand, the sodium cation flows against the electric field gradient and the chloride anion is promoted by it. For this reason, the chemical potential of chloride is bigger than that of the sodium and it produces more accumulation of chloride mass in liquid phase (Figure 3) than the sodium mass.

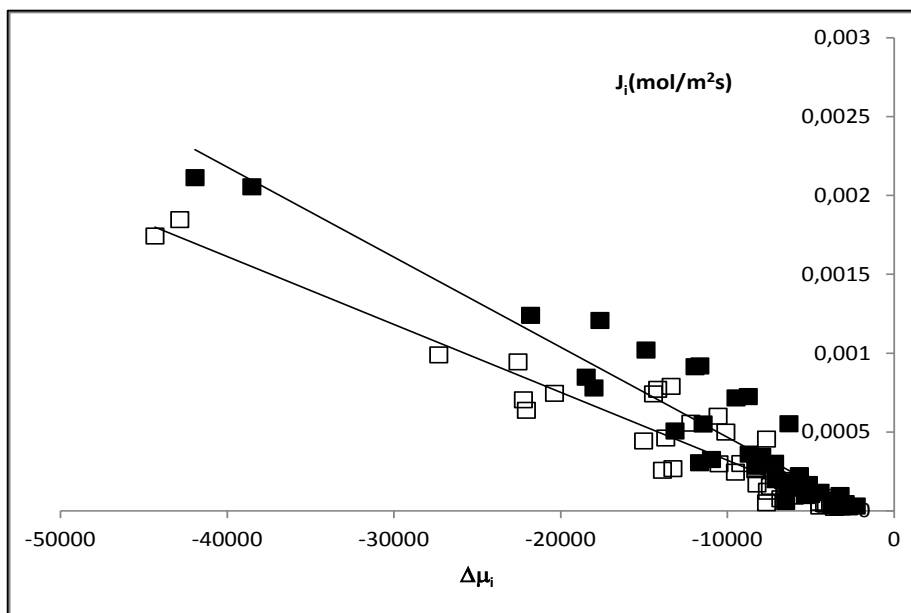


Figure 14. Variation of the sodium (■) and chloride (□) fluxes with regard to the respective chemical potentials.

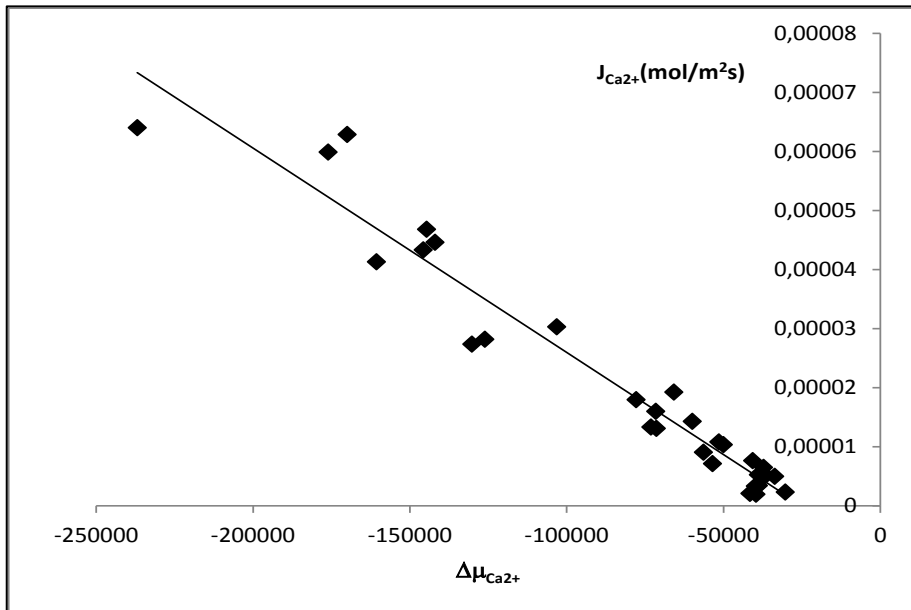


Figure 15. Variation of the calcium (■) flux with regard to the chemical potential.

4. CONCLUSIONS

Nonlinear irreversible thermodynamic model has been developed to determine the transport of water and ions through the structure of cheese, obtaining a phenomenological coefficient of $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ J}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. This model describes various phenomena that occur in salting cheese process, including the different driving forces, electrical and mechanical activity terms. The importance of the role of the calcium ion has been demonstrated, not only in the structural changes that occur at protein level, but also as a transport inductor due to his role in the generation of the electric field. It was also shown that cheese undergoes strong contractions and expansions that are transmitted fast to the driving forces, leading to strong variations in the mass fluxes, especially at the beginning of treatment. In addition, osmotic dehydration also causes loss of native components of cheese, mainly calcium.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación throughout the project AGL2011-30096. Author Marta Castro-Giráldez thanks the Campus de Excelencia Internacional VLC/CAMPUS for their support. Author J. Velázquez-Varela thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México for their support.

6. REFERENCES

Aguilera, J.M., & Stanley, D.W. (1999). Food Structuring. In J. M. Aguilera & D.W. Stanley (Eds.), *Microstructural principles of food processing and engineering* (pp. 190-230). Ed. Aspen Publication, Gaithesburg, Maryland.

Atkins, P.W. & De Paula, J. (2006). Chemical equilibrium. In P.W. Atkins, & J. De Paula (Eds.), *Physical Chemistry* (pp. 200-240), Oxford University Press, Great Britain.

Baroni, A.F., Menezes, M. R., Adell, E.A.A., & Ribeiro, E.P. (2003). Modeling of prato cheese salting: fickian and neural network approaches. In: J. Welte-Chanes, J.F. Velez-Ruiz & G.V. Barbosa-Canovas (Eds), *Transport phenomena in food processing*, CRC Press, Boca Raton, USA.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., & Fito, P. (2010a). Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 484-490.

Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F., & Fito, P. (2010b). Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 376-386.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., M. Dalla Rosa b, & Fito, P. (2011). Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling

osmotic dehydration of kiwifruit (*Actinidia deliciosa cv Hayward*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 623–627.

Crank, J. (1985). *Mathematics of Diffusions*. Oxford University Press, New York.

Demirel, Y. (2002). Chapter 1: Fundamentals of Equilibrium Thermodynamics, and Chapter 11: Thermodynamics and Biological Systems. In Y. Demirel (Ed.), *Nonequilibrium Thermodynamics. Transport and Rate Processes in Physical, Chemical and Biological Systems* (pp. 1-52, and pp. 541-598). Elsevier Science & Technology Books, USA.

Everett, D.W., Rowney M.K., Hickey M.W., & Roupas P.(2004). Salt-induced structural changes in Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation in ripening cheese. *Le Lait. Dairy Science and Technology*, 84, 539-549.

Fito, P., LeMaguer, M., Betoret, N., & Fito, P.J. (2007). Advanced food process engineering to model real foods and processes: The “SAFES” methodology. *Journal of Food Engineering*, 83(2), 173-185.

Fito, P., Le Maguer, M., Betoret, N., & Fito, P.J., (2008). Advanced food products and process engineering (SAFES) I: concepts and methodology. In G.F. Gutiérrez-López, G.V. Barbosa-Cánovas, J. Welte-Chanes & E. Parada-Arias (Eds.), *Food Engineering Integrated Approaches* (pp. 117–137). Food Engineering Series, Springer, USA.

Floury, J., Rouaud, O., Le Poullennec, M., & Famelart, M.H. (2009). Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1621-1628.

Gekas, V. (2001). Mass transfer modeling. *Journal of Food Engineering*, 49, 97-102.

Guinee, T.P. & Fox, P.F. (1986). Transport of sodium chloride and water in Romano-type cheese slices during brining. *Food Chemistry*, 19, 49-64.

Guinee, T.P. & Fox, P.F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan & Timothy P. Guinee (Eds.), *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 207-259). Elsevier Ltd., Ireland.

Hardy, J. (1976). Etude de la diffusion du sel dans les fromages à pâte molle de type camembert. Comparaison du salage à sec et du salage en saumure, Ph.D. Thesis, Université Nancy, France.

Langmuir, D. (1997). Activity coefficients of dissolved species. In Robert McConnin (Ed.), *Aqueous environmental geochemistry* (pp. 123-148). Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Lawrence, R.C., & Gilles, J. (1982). Factors that determine the pH of young Cheddar cheese, *N. Z. J. Dairy Science and Technology*, 17, 1-14.

Lopez, C., Camier B., & Gassi J.Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17, 235-247.

Luna, J.A., & Bressan, J.A. (1986). Mass-transfer during brining of Cuartirolo Argentino cheese. *Journal of Food Science*, 51 829-831.

Luo, J., Pan, T., Guo, Y., & Ren, F.Z. (2012). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. *Journal of Dairy Science*, 96, 824-831.

Turhan, M., & Gunasekaran, S. (1999). Analysis of moisture transfer in White cheese during brining, *Milchwissenschaft*, 54, 446-450.

Yanniotis, S., & Anifantakis, E. (1983). Diffusion of salt in dry-salted Feta cheese. In R. Jowitt, F. Escher, B. Hallstrom, H.F.T. Meffert, W.E.L. Spiess, & G. Vos (Eds.), *Physical Properties of Foods*, Applied Science Publishers, London, UK.

Parte 4

En esta parte de la tesis doctoral se describe los resultados obtenidos tras la consecución de los objetivos, dando lugar a la publicación;

4.4 Analysis of dielectric properties in the salting cheese process at microwave frequency range

El proceso de elaboración de queso conlleva la concentración de caseína y grasa, principalmente, donde intervienen varias etapas y diversas transformaciones bioquímicas, influyendo sobre el rendimiento, la composición y calidad del queso. En consecuencia, el análisis del proceso de fabricación de un queso resulta complejo y difícil de explicar de forma sencilla. Por todo ello, es necesario analizar de manera adecuada las diferentes transformaciones físicas y químicas y conocer los factores que influyen en estas, para poder explicar el proceso de fabricación del queso con base a principios científicos. Durante la última década se ha puesto de manifiesto la importancia de desarrollar nuevos métodos rápidos de análisis con el fin de controlar el proceso de elaboración de productos de calidad de una forma segura y eficiente. El desarrollo y aplicación de métodos novedosos, contribuye a obtener resultados con mayor rapidez, significando en la mayoría de los casos, la optimización y maximizar los recursos.

(submitted)

ANALYSIS OF DIELECTRIC PROPERTIES IN THE SALTING CHEESE PROCESS AT MICROWAVE FREQUENCY RANGE

J. Velázquez-Varela, M. Castro-Giráldez,* P.J. Fito

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

*For correspondence: marcasgi@upv.es

Keywords: cheese, brining, dielectric properties

Abstract

Salting process involves complex phenomena that affect to the overall cheese quality, due to its effect on water activity and the biochemical changes that induces (glycolysis, proteolysis, and lipolysis). The water and salt transports were investigated by dielectric spectroscopy during cheese salting treatment. The dielectric properties were determined from 500MHz to 20GHz, by using an Agilent 85070E open-ended coaxial probe connected to an Agilent E8362b Vector Network Analyzer. Results showed that dielectric constant (ϵ') decreases gradually as treatment time and frequency increases. The dielectric loss factor (ϵ'') decreases as treatment time and frequency increases. A clear relationship was observed between moisture content and dielectric constant. The dielectric data obtained was used to predict the moisture and inorganic salt content of experimental set of process cheese samples. Moisture, water activity and volume were also measure. It was conclude that dielectric spectroscopy has potential tool to determine the level of salting during cheese manufacture.

1 Introduction

Cheese production is a complex process, which involves different units operations and biochemical transformations (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006). Salting treatment is an important operation in the cheese manufacture, the salt principally used is sodium chloride (NaCl), which serves for many purposes: to improve the flavour, texture and colour, also to kill off the starter cultures used in the cheese-making process preventing further growth and the acid development. In addition, it also helps to adjust the moisture content in cheese (Mamdouh, 2012; Payne & Morison, 1999).

Cheese consists on a matrix of protein, with fat and water components as an emulsion (Dickinson & Miller, 2001; Green, 1997). Essentially the matrix is composed of calcium phosphate-paracasein overlapping and cross-linked strands of partially fused paracasein aggregates (paracasein micelles), the integrity of the matrix is maintained by various intra- and inter-aggregate hydrophobic and electrostatic attractions (Fox, O'Connor, McSweeney, Guinee, & O'Brien, 1996). The addition of salt in cheese affects to its functional characteristics (Floury, Camier, Rousseau, Lopez, Tissier, & Famelart, 2009), principally in the protein hydration and the modification of the water binding capacity of casein within the cheese matrix, affecting the stability properties (Mamdouh, 2012).

Salting process is usually done using brines, where the control of NaCl content is very important to determine the physicochemical characteristics of cheese. It is necessary to obtain a technique which allows us to determine, in a rapid and easy way, the salt content in cheese; this still remains as an unsolved problem in the food industry (Chevalier, Ossart, & Ghommidh, 2006). In this sense, microwave dielectric spectroscopy has been investigated (Castro-Giráldez, Fito, P.J., & Fito, 2010). A dielectric spectroscopy technique has also been used for on-line monitoring

of salt content in butter (Shiinoki, Motouri, & Ito, 1998), ripening and moisture content in Parmigiano-Reggiano cheese (Cevoli, Ragni, Gori, Berardinelli, & Fiorenza, 2012), the effects of frequency, temperature, moisture and salt content on the dielectric properties of process cheese (Everard, Fagan, O'Donnell, O'Callaghan, & Lyng, 2006), the effect of calcium content on dielectric properties of model cheese (Smith, Carr, Golding, Reid, & Zhang, 2011), the viability of controlling salting meat processes by using spectroscopy measurements at microwaves frequencies (Castro-Giráldez et al., 2010), and the influence of moisture and inorganic salt content on dielectric properties in process cheese (Fagan, Everard, O'Donnell, Downey & O'Callaghan, 2005). Moreover, dielectric measurements have been used extensively in the analysis of cheese composition and cheese maturity (Ball, Horsfield, Holdem, Keam, Holmes, & Green, 1996; Everard et al., 2006; Green, 1997; Herve, Tang, Luedecke, & Feng, 1998; Kubiš, Krivanek, & Gajdusek, 2001). Amhed, Ramaswamy, & Raghavan, (2007) determined the dielectric properties of salted and unsalted butter over the MW frequency range. Everard et al. (2006) investigated the effect of temperature on the dielectric properties of cheeses; Nelson and Bartley (2000) reported the dependence of the frequency and temperature, in dielectric properties of cheese. All these studies show the feasibility of the use of dielectric spectroscopy for monitoring different properties in food processes (Castro-Giráldez et al., 2010).

Complex permittivity (ϵ^*) describes the behaviour of the material when is subjected under the influence of an extern electric field (Nelson and Datta, 2001). The two components of the complex permittivity, (ϵ') and (ϵ''), are called dielectric constant and loss factor, respectively. The dielectric constant represents the real part of complex permittivity, and it is related with the material ability to store energy; the loss factor (ϵ'') represents the imaginary part, which is related to the absorption and dissipation

of the energy in other kinds of energy (Castro-Giráldez et al., 2010; Schwan, 1988).

In the range of microwaves, the interaction of the electric field with foods produces two main effects, γ -dispersion and ionic conductivity. The first one is caused by dipolar molecules orientation and induction, and it is produced at GHz frequencies (Mohiri, Burhanudin & Ismail, 2011). The other important effect in microwave range is ionic conductivity; the application of an electric field causes the vibration of food ions increasing the internal energy of the molecules.

This paper is the second part of a wider study about cheese salting process; the first part presented a nonlinear irreversible thermodynamic model to determine the transport of water and ions throughout the cheese structure (Velázquez-Varela, J., Fito, P.J. & Castro-Giráldez, M. 2014). The aim of the present study is to investigate the dielectric properties of cheese during salting process to assess the potential use of dielectric spectroscopy to improve this process.

2 Material and Methods

2.1 Raw material

18 cheeses were proportionated by FORMATGERIA GRANJA RINYA S.L. factory (Valencia, Spain). All the cheeses were fresh Tronchon type, they were conducted under the same pressing conditions and with identical compositional characteristics. The cheeses were provided unsalted and just after the pressing operation. Samples were obtained from the center of each cheese. Brine was prepared with sodium chloride (PRS-codex, Panreac® Química SA, Barcelona, Spain) and distilled water.

2.2 Salting Operation

Experimental flowchart is shown in figure 1, where it is possible to observe the salting treatment conditions using 25% (w/w)

sodium chloride brine at 4°C. 72 cheese cylinders (30 mm diameter and 10 mm thick) were cut. Samples were immersed in a vessel containing the osmotic solution with continuous stirring, for 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 900 and 1440 min; later they were equilibrated in an isothermal chamber at 4°C for 24 hours.

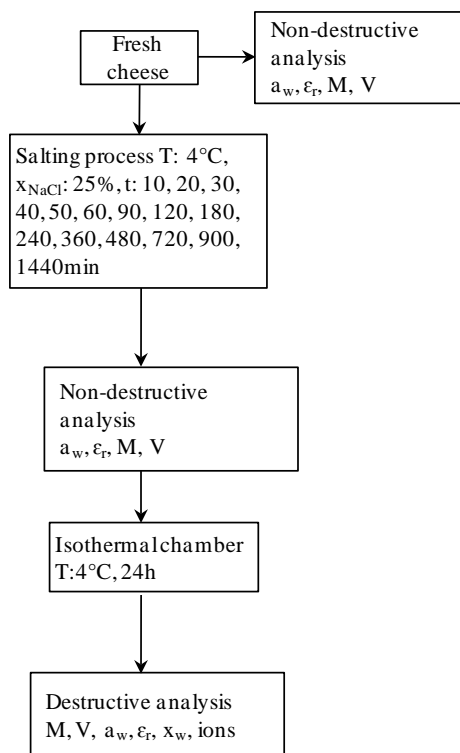


Figure 1 Diagram of the experimental procedure.

Mass was determined by using a Mettler Toledo Balance (± 0.0001) (Mettler-Toledo, Inc., USA). The surface water activity was determined by a dew point hygrometer Decagon (Aqualab® series 3TE) with precision ± 0.003 . Also the water activity of the solution (brine) was measured at each osmotic time. Measurements were done in structured samples (not minced), thus a_w obtained is considered to be surface a_w . Water content was determined by AOAC Method 934.06 (2000). The volume was determined by image analysis (Canon® Power Shot SX210 IS),

using Adobe Photoshop® software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) in order to get the diameter and the thickness of the samples. Ion and cation content was carried out by means of an ion chromatograph (Methrom Ion Analysis, Herisau, Switzerland), using an universal standard column (Metrosep C2–150, 4.0 x 150 mm) along with an eluent composed of tartaric acid (4.0 mmol/L) and dipicolinic acid (0.75 mmol/L), equipped with electronic detectors. In every case, the cheese samples were previously homogenized at 4200 rpm in an Ultraturrax T25 for 5 min and centrifuged (J.P. Selecta S.A., Medifriger-BL, Barcelona, Spain) at 8000 rpm for 20 min at 4°C. Afterwards, 1 mL of supernatant was diluted with Milli®-Q water in a 250 mL Erlenmeyer flask. The clarified extract was filtered through a 0.45 µm Millipore filter; 15 mL was used to analyze the anion content. Measurements were made in duplicate.

Representative fresh samples and reposed samples were used to obtain images of the microstructure by Cryo-SEM.

2.3 Dielectric properties measurement.

Dielectric properties were measured by using an Agilent 85070E Open-ended coaxial probe connected to an Agilent E8362B vector network analyzer. The software of the network analyzer calculates the dielectric constant and loss factor. The system was calibrated by using three different types of loads: open circuit (air), short-circuit and 4°C distilled water.

The dielectric properties were measured by attaching the probe to the surface of the samples at 4°C from 500 MHz to 20 GHz. The mean values of at least three replicates of the cheese samples are reported in this article.

2.4 Low temperature scanning electron microscopy (Cryo-SEM).

A Cryostage CT-1500C unit (Oxford Instruments, Witney, UK), coupled to a Jeol JSM-5410 scanning electron microscope (Jeol,

Tokyo, Japan), was used. The sample was immersed in slush N₂ (-210°C) and then quickly transferred to the Cryostage at 1 kPa, where sample fracture took place. The sublimation (etching) was carried out at -95°C; the final point was determined by direct observation in the microscope, working at 5 kV. Then, once again in the Cryostage unit, the sample was coated with gold in vacuum (0.2 kPa), applied for 3 min, with an ionization current of 2 mA. The observation in the scanning electron microscope was carried out at 15 kV, at a working distance of 15mm and a temperature ≤ 130°C.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with the Statgraphic Centurion®, version 16.2.04 (Statpoint Technologies, Inc, U.S.A.). Multiple regression factorial analyses were made in order to find significant interaction among dielectric constant at 20 GHz with the number of water molecules and the water fluxes. Moreover, multiple regression factorial analyses were made in order to find significant interaction among conductivity at 0.5 GHz with the number of Calcium, Chloride, and Sodium molecules and the Sodium chloride fluxes.

3 RESULTS

Cheese samples were measured during salting treatment and after 24 hours of repose. During the 24 hours of repose, samples were on disposable sample cups, closed with parafilm®, and preserved in an isothermal chamber in order to isolate the samples and to reach the equilibrium. The salting process in brine produces a movement of ions (Na⁺ and Cl⁻) from the brine into the cheese, because of the osmotic pressure difference between the cheese and the brine. Simultaneously, water molecules leave the cheese matrix to restore the equilibrium. In cheese, the mass water lost is higher than the amount of salt incorporated; as a

result, there is a loss of weight in the cheese (Velázquez-Varela et al., 2014).

The desorption isotherms of treated and equilibrated samples were obtained in order to estimate the moisture of the surface (x_w^{surf}) (Figure 2). Water activity is a surface measurement and moisture is an average value of the whole sample. Equilibrated samples did not have moisture profiles; therefore, equilibrated isotherm represents the real relation between moisture and water activity. Thus, the equilibrated isotherm is an excellent tool to obtain, with the surface water activity of treated sample, the surface moisture of treated samples. In the figure 2, it is also possible to observe an increase in the surface water activity caused by the internal fluxes that occur in cheese during the repose time.

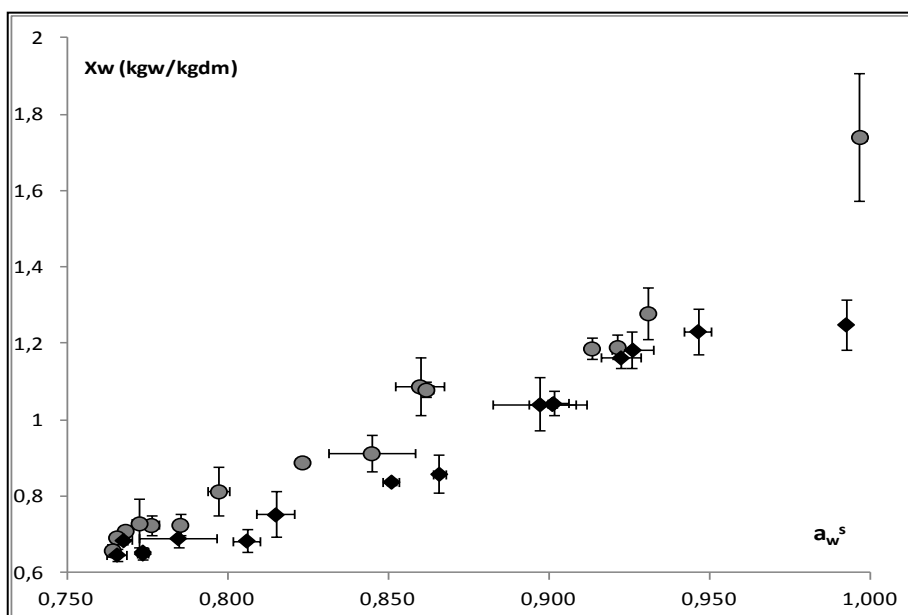


Figure 2. Desorption isotherm of treated (●) and equilibrated (◆) samples.

The water and salt fluxes were calculated as follows:

$$J_w^{0h} = \frac{-\Delta M_w^{0h} \cdot M_0}{\Delta t \cdot S \cdot Mr_w} \quad (\text{Equation 1})$$

$$J_{\text{NaCl}}^{\text{0h}} = \frac{-\Delta M_{\text{NaCl}}^{\text{0h}} \cdot M_0}{\Delta t \cdot S \cdot Mr_{\text{NaCl}}} \quad (\text{Equation 2})$$

Where, J is the flux (mol s m^{-2}), ΔM represents the mass variation (dimensionless), M_0 is the initial mass of the sample (g), Δt is the process time, S is the area of the sample during treatment (m^2), Mr is the molecular weight of the compound (18 g mol^{-1} for water and 58.4 g mol^{-1} for sodium chloride), the subscripts “w” and “NaCl” represents water and sodium chloride, respectively. The superscript “0h” represents the non-equilibrated samples.

In figure 3, the water and NaCl molar fluxes are shown. These fluxes decrease with time, caused by a decrease of the engine of the transport (chemical potential) throughout the treatment (Velázquez-Varela et al., 2014).

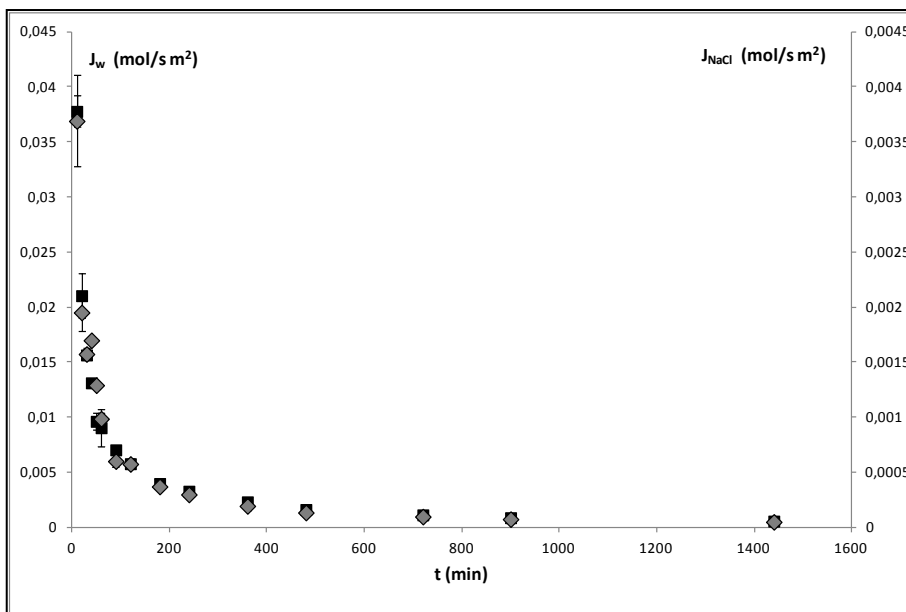


Figure 3. Evolution of water (■) and NaCl (◆) fluxes throughout the osmotic treatment.

In order to understand the electric behaviours affected by water and ions molecules in the sample surface, it is necessary to calculate its content in the surface. The surface water mass fraction was calculated by using the surface water activity of the

treatment, from the equilibrated isotherm. The surface sodium chloride mass fraction was estimated by using the surface water activity following the model of Fito et al. (Fito, Fito, Betoret, Argüelles & Chenoll, 2011). Figure 4 shows the evolution of the overall value of water mass fraction and the water mass fraction in the surface, both expressed in liquid phase throughout the salting treatment (non-equilibrated samples).

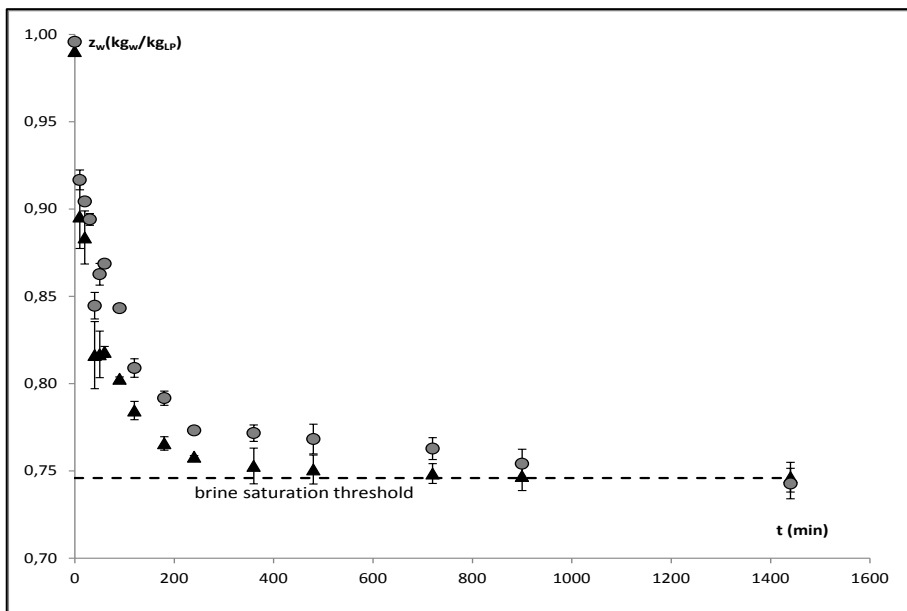


Figure 4. Evolution of the surface water mass fraction in the liquid phase with regard to the treatment time, where: (▲) represents the value of the sample surface, and (●) represents the average value.

In order to understand the interpretation of the microwave signal, it is necessary to know its penetration depth (DP), which was calculated as follows (Metaxas and Meredith, 1983):

$$D_P = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{2\varepsilon'}} \left[(1 + \tan^2 \delta)^{1/2} - 1 \right]^{-1/2} \quad (\text{Equation 3})$$

where λ_0 is the wavelength, being 60 cm at 0.5 GHz and 1.5 cm at 20 GHz, $\tan \delta$ is the loss tangent ($\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}$).

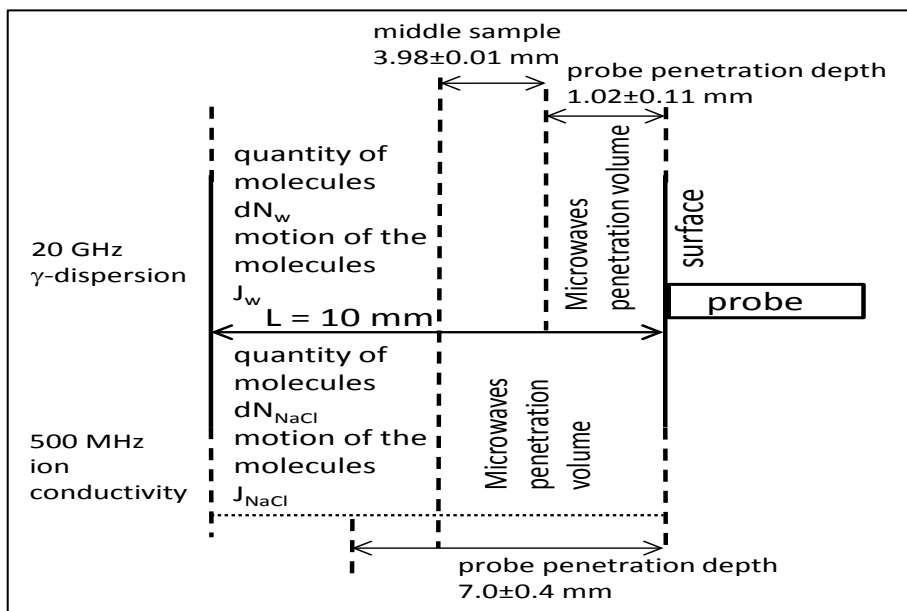


Figure 5. Scheme of the dielectric properties measurements of cheese samples throughout the salting treatment.

In Figure 5 shows a scheme of cheese sample in contact with the microwave probe, where the penetration depth of electric field at 20 GHz and 0.5 GHz are shown. At frequency range of 20 GHz the predominant effect is the γ -dispersion, it is explained as the induction and orientation of the dipolar molecules. The most important dipolar molecule is water, therefore water status can be studied in this spectral range. The two properties that influence in the dispersion is the number of the water molecules and its mobility. During the salting process, the microwave penetration volume (MPV) reaches before a minimum quantity of water molecules than the rest of the sample volume; so far, the dielectric signal will be affected by the losses of the water molecules. When the steady state is reached at the surface, the sample will continue losing water molecules from the rest of the sample volume, generating a water flux across the MPV, changing the mobility of water molecules and, therefore, being the major effect of the dispersion.

Figure 5 shows, at the bottom of scheme, the effect at 500 MHz. With regard to the dielectric losses, the ionic conductivity is the major contribution to the dielectric losses. The ionic conductivity does not affect to the electric storage because no molecular orientation occurs by electric field. The conductivity value changes with the quantity and mobility of the electrolytes (chloride, sodium and calcium). The penetration index reaches the whole sample, indicating an average value of the state of ions. The saturation value of the liquid phase is rapidly reached, taking a constant value of the ions molecules. Nevertheless, the fluxes of water and calcium maintain the fluxes of sodium and chloride (Velazquez et al., 2014), changing the value of the conductivity.

Figure 6 shows the dielectric constant and the loss factor spectra of the samples just after the salting treatment.

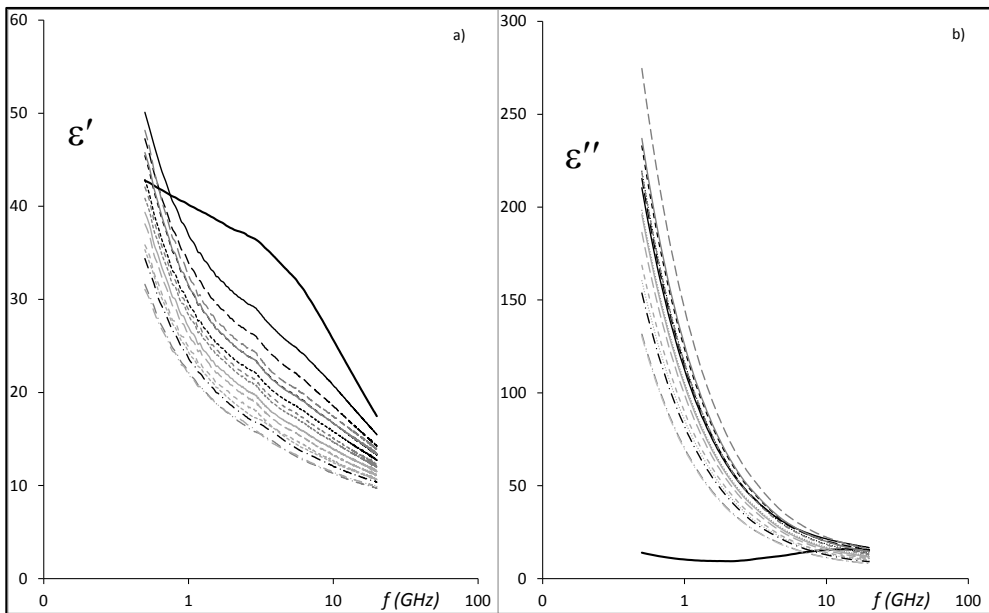


Figure 6. Evolution of the dielectric constant and loss factor spectra of the samples throughout the treatment (non-equilibrated samples), where: (—) 0 min; (—) 10 min; (- - -) 20 min; (- - -) 30 min; (...) 40 min; (—) 50 min; (- - -) 60 min; (- - -) 90 min; (...) 2 h; (—) 3 h; (- - -) 4 h; (- - -) 6 h; (...) 8 h; (- . . .) 12 h; (- . . .) 15 h; (- . . .) 24 h.

It is also important to analyze the water molecules in the sample surface by dielectric spectroscopy. For this purpose, there were calculated the number of water and ions molecules by using the surface mass fraction in the case of water, and ions mass fraction of the sample in the case of ions (Equation 4).

$$N_j = \frac{x_j N_A}{M_{r_j}} \quad (\text{Equation 4})$$

Where: N represents the molecules ($\text{molecules} \cdot \text{g}_{\text{dm}}^{-1}$), X_j is the surface moisture expressed by solid matrix (neither water nor ions) in the case of water ($\text{g}_w \cdot \text{g}_{\text{SM}}^{-1}$) and ion mass fraction (sodium, calcium and chloride) expressed by solid matrix (neither water nor ions) in the case of ions ($\text{g}_i \cdot \text{g}_{\text{SM}}^{-1}$), N_A is the Avogadro constant ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) and M_{r_j} is the molecular weight, being $18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ for water, $22.99 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ for sodium, $40.08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ for calcium and $35.45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ for chloride.

The interaction of the electric field with cheese in γ -dispersion is affected by the amount of water molecules and its motion. Multiple regression factorial analyses were made in order to find significant interaction amongst the dielectric constant at 20 GHz with the number of water molecules and the water fluxes throughout the salting treatment. This analysis showed that the relation between dielectric constant at 20 GHz and the number of water molecules is significant ($p < 0.05$) until the surface saturation phenomena of cheese liquid phase, i.e. during the first 180 minutes of treatment. The analysis also showed that there exists a very significant ($p < 0.01$) relation between the dielectric constant at 20 GHz and the water flux from the 90 minutes until the end of the treatment. In figure 7, the relation between the dielectric constant at 20 GHz and the number of the surface water molecules in non-equilibrated samples was represented. It is possible to observe that there exists a linear relationship between both variables at the beginning of the salting treatment

as was explained before; thus, the surface water molecules can be obtained by measuring the dielectric constant at 20 GHz when the surface is in unsteady state. When the system reaches the steady state in the surface, the amount of water molecules is constant but the water is still flowing throughout this volume, coming from the middle of samples and changing the motion of the water molecules in the penetration microwaves volume. Therefore, the capability of water molecules to be induced and orientated, change with this water flux. In figure 8, it is possible to observe that the dielectric constant at 20 GHz is related very significantly ($p < 0.01$) with the water flux after 90 minutes of treatment, at which the steady state is reached by the system. Therefore, the dielectric model to predict the water losses has to be non-linear, explaining not only the water losses in the penetration microwaves volume, but also in overall product, because when the penetration microwave volume reaches the steady state, the model predicts the water flux.

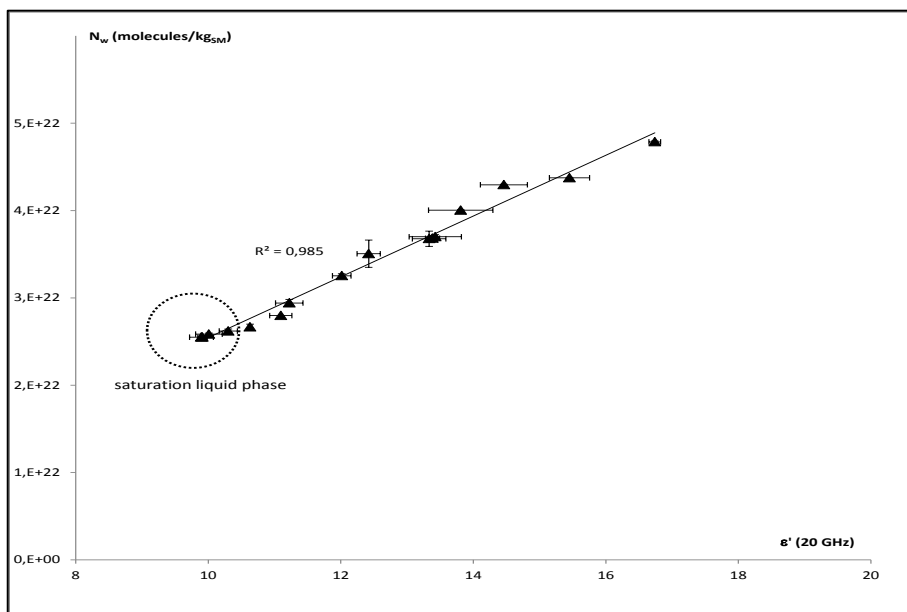


Figure 7. Relation of the dielectric constant at 20 GHz with regard to the number of surface water molecules in solid matrix throughout the salting treatment.

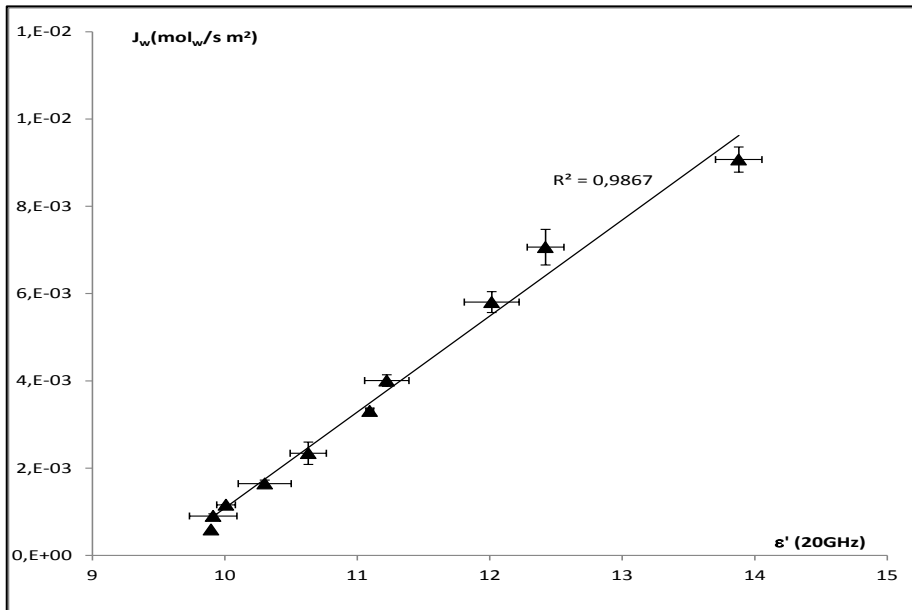


Figure 8. Evolution of the water flux with regard to the dielectric constant at 20 GHz.

The conductivity of the sample (σ) was calculated at 0.5 GHz as follows:

$$\sigma = \varepsilon'' \varepsilon_0 \omega \quad (\text{Equation 5})$$

Where: ω is the angular frequency, and the ε_0 is the dielectric constant in vacuum ($\varepsilon_0=8.8542 \cdot 10^{-12}$ F/m).

The conductivity at 0.5 GHz was represented with regard to the amount of ions molecules of the sample estimated by equation 4 (Figure 9). It is important to highlight that, at this frequency, the microwaves penetration depth covers the most part of the sample; thus, the conductivity can be considered an overall value of the whole sample.

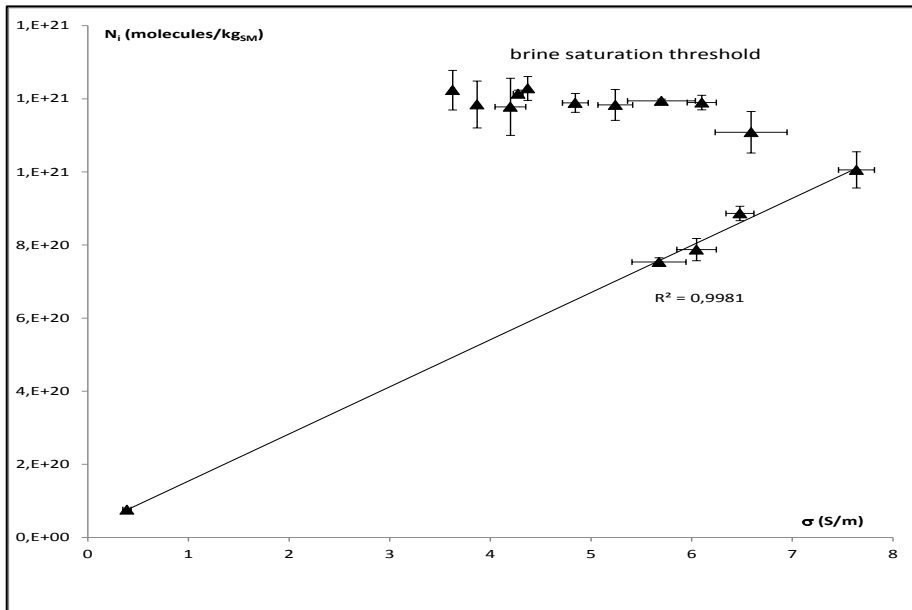


Figure 9. Conductivity at 0.5 GHz with regard to the mass fraction of sodium chloride in the liquid phase of the sample surface.

In the figure 9, at first 60 minutes of salting, a linear relation between the accumulation of the electrolytic molecules and ionic conductivity can be appreciated (being considered chloride, sodium and calcium), being very significant ($p < 0.01$). When saturation is achieved, in the liquid phase, the conductivity decreases. So, in the first period (until 60 minutes) conductivity changes very significantly with the accumulation of electrolyte molecules, but from this time it is no longer significant.

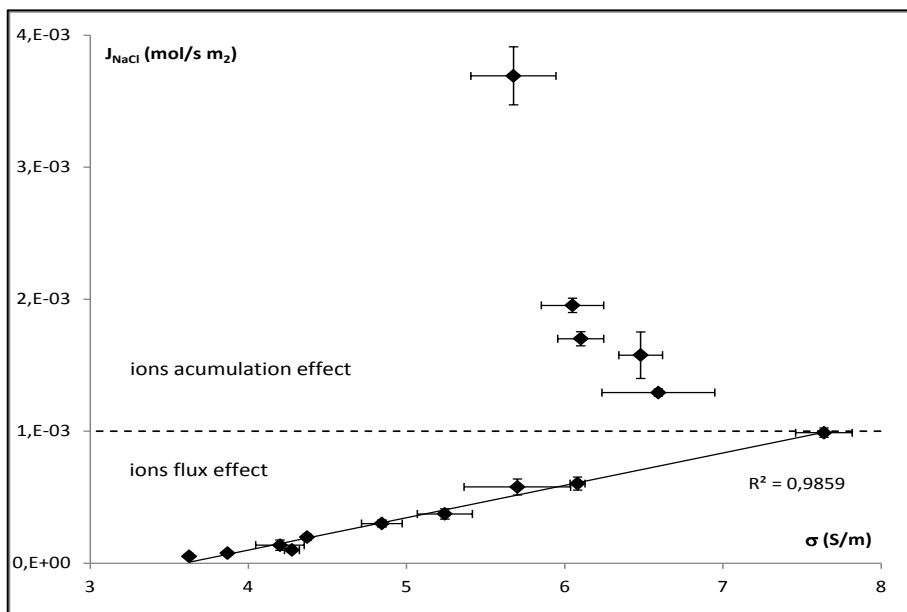


Figure 10. Flux of sodium chloride with regard to the conductivity.

After 60 minutes, when the relation between the conductivity and the accumulation is non significant, the conductivity begins to decrease. This decrease is promoted by a decrease in the mobility of the electrolytic molecules in the liquid phase, sodium, chloride and calcium. The cause of mobility in this period of salting is the motion produced by the ion fluxes, where the fluxes are induced by the absorption of sodium and chloride ions in the casein matrix and by the loss of calcium from the casein structure (Velázquez et al., 2014). In Figure 10 it can be observed, from 60 minutes, a very significant ($p < 0.01$) linear relationship between the sodium chloride flux and the ionic conductivity till the end of the process. Therefore, it is possible to predict the level of salting and thus the structural changes in the casein with the measurement of the conductivity at 500 MHz.

4 Conclusions

The Non-linear model proposed by using the dielectric constant at 20 GHz explains not only the water losses in the MPV, but also in overall product, because when the MPV reaches the steady state,

the model predicts the water flux. In case of salting prediction, the ionic conductivity estimated at 500 MHz explains the level of salting, and for bigger samples, the variable can be explained, because it is related not only with the accumulation of the electrolyte molecules, but also with the fluxes.

Therefore, coupled measurements of dielectric properties at 20 GHz and 500 MHz can predict the chemical species involved in cheese salting process, and its structural changes.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación throughout the project AGL2011-30096. Author Marta Castro-Giráldez thanks the Campus de Excelencia Internacional VLC/CAMPUS for their support. Author J. Velázquez-Varela thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México for their support.

REFERENCES

- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., & Raghavan, V. G. S. (2007). Dielectric properties of butter in the MW frequency range as affected by salt and temperature. *Journal of Food Engineering*, 82 (3), 351-358.
- Ball, J. A. R., Horsfield, B., Holdem, J. R., Keam, R. B., Holmes, W. S., & Green, A. (1996). Cheese curd permittivity and moisture measurement using a 6-port reflectometer. In *Asia Pacific Microwave Conference*, New Delhi.
- Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., & Fito, P. (2010). Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 484-490.
- Cevoli, C., Ragni, L., Gori A., Berardinelli A., & Fiorenza C. M. (2012). Quality parameter assessment of grated Parmigiano-

Reggiano cheese by waveguide spectroscopy. *Journal of food engineering*, 113, 201-209.

Chevalier, D., Ossart, F., & Ghommidh, C. (2006). Development of a nondestructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, 342–347.

Dickinson, E., & Miller, R. (2001). *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry, UK.

Everard C.D., Fagan C.C., O'Donnell C.P., O'Callegan D.J., & Lyng J.G. (2006) Dielectric properties of process cheese from 0,3 to 3 GHz. *Journal of food engineering*, 75, 415-422

Fito, P, Fito, P.J, Betoret, N., Argüelles A. & Chenoll, C. (2011) Thermodynamic approach to equilibrium isotherms in salted structured food. *Journal of Food Process Engineering*, 34(3) 623–638

Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J. P., & Famelart, M. H. (2009). Reducing salt level in food: Part 1. Controlled manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *LWT – Food Science and Technology*, 42 (10), 1611–1620.

Fox, P.F., O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., & O'Brien, N.M. (1996). Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. *Advances. Food Nutrition Research*, 39, 163-328.

Green, A. D. (1997). Measurements of the dielectric properties of Cheddar cheese. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 32, 16–27.

Herve, A. G., Tang, J., Luedecke, L., & Feng, H. (1998). Dielectric properties of cottage cheese and surface treatment using microwaves. *Journal of Food Engineering*, 37, 309–410.

- Kubiš, I., Krivanek, I., & Gajdusek, S. (2001). The relationships between the chemical, dielectric and sensory properties of Edam cheese during ripening. *Czech Journal of Food Science*, 19, 85–89.
- Mamdouh, El-Bakry. (2012). Salt in Cheese: A Review. *Current Research in Dairy Sciences*, 4, 1-5.
- Metaxas A. C. & Meredith R. J. (1993). Theoretical aspects of volumetric heating. In: *Industrial Microwave Heating* (Chapter 4, pp. 70-103). IEE Power Engineering Series 4. Peter Peregrinus Ltd. UK.
- Mohiri, A., Burhanudin, A. Z., & Ismail, I. (2011). Dielectric Properties of Slaughtered and Non-slaughtered Goat Meat. In *IEEE International RF and Microwave Conference*. Malaysia.
- Nelson S. O. & Bartley P. G. (2000). Measurement frequency- and temperature-dependent dielectric properties of food materials. *Transactions of the ASAE*, 43, 1733–1736.
- Nelson, S.O. & Datta, A.K. (2001). Dielectric properties of food materials and electric field interactions. In: A.K. Datta and R.C. Anantheswaran (Eds), *Handbook of Microwave Technology for Food Applications*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Payne, M.R. & Morison, K.R. (1999). A multi-component approach to salt and water diffusion in cheese. *International Dairy Journal*, 9, 887–894.
- Schwan, H. P. (1988). Dielectric spectroscopy of biological cells. In *Special Issue on Electricity and Biophysics*, T. Mitsui, F. Oosawa, and S. Takashima (Eds.), *Ferroelectrics*. 86, 205-223.
- Shiinoki, Y., Motouri, Y. & Ito. K. (1998). On-line Monitoring of Moisture and Salt Contents by the Microwave transmission Method in a Continuous Salted Butter-making Process. *Journal of Food Engineering*, 38, 153-167.
- Smith, J., Carr, A., Golding, M., Reid, D. & Zhang, L. (2011) Assessing the use of dielectric spectroscopy to analyse calcium

induced compositional and structural changes in a model cheese. Selection of 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). Proceedings Food Science, 1, 1833 – 1840

Velázquez-Varela, J., Fito, P.J. & Castro-Giráldez, M. (2014). Thermodynamic analysis of salting cheese process. Journal of Food Engineering, “In press”

Venkatesh, M.S. & Raghavan, G.S.V. (2004). An Overview of Microwave Processing and Dielectric Properties of Agri-food Materials, Biosystems Engineering, 88 (1), 1-18

Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). Dairy science and technology. (2nd ed.). Florida: Taylor & Francis Group, LLC.

Wang, S., Tang, J., Johnson, J. A., Mitcham, E., Hansen J. D., Hallman, G., Drake, S.R. & Wang, Y. (2003). Dielectric Properties of Fruits and Insect Pests as related to Radio Frequency and Microwave Treatments. Biosystems Engineering, 85 (2), 201–212.

Parte 5

En esta parte de la tesis doctoral se describe los resultados obtenidos, y corresponde con el quinto objetivo particular, dando lugar a la publicación;

4.5 Structural analysis of collagen gel by dielectric spectroscopy in radiofrequency and microwaves range

El uso de geles ha ido aumentando considerablemente dentro de la industria alimentaria, debido a su empleo en la formulación de alimentos. Gracias al desarrollo de la ciencia y la tecnología de los alimentos en los últimos 50 años, se han descubierto varias sustancias nuevas que pueden cumplir funciones útiles en los alimentos. Entre ellas, destacan las gomas y geles por su poder espesante y gelificante en los alimentos.

Las propiedades dieléctricas en el rango de las microondas y de radiofrecuencia representan una técnica emergente de control. Esta técnica se puede utilizar para la obtención de información valiosa, sobre las transformaciones que ocurren en los sistemas biológicos cuando se someten a procesos; por ejemplo, en la elaboración de productos alimenticios.

Journal of food engineering

(submitted)

STRUCTURAL ANALYSIS OF COLLAGEN GEL BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY IN RADIOFREQUENCY AND MICROWAVES RANGE

Velázquez-Varela, J.¹, Castro-Giráldez, M.¹, Monzó, J.M.², Colom, R.², Fito, P.J.*¹

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

²Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

**author for correspondence: pedfisu@tal.upv.es*

Abstract

A parametric model was developed to describe the variation of the dielectric properties of collagen gels in a wide range of frequencies. The collagen gels were formulated at different protein concentrations. The dielectric spectrum was modelled from 40Hz to 20GHz with three dispersion regions. The purpose of this work is to enable the prediction of dielectric data in a protein colloidal structure and subsequently increase the complexity with real protein foods like meat.

1 Introduction

Collagens are modular triple helical proteins that constitute the major structural components of the extracellular matrix and connective tissue in biological systems (Khosshnoodi et al., 2006). In fact, they are considered the most abundant proteins in the animal kingdom (Lodish et al., 2000). Usually, they can be found as part of diverse superstructures such as fibrils, micro-fibrils and networks, which play the role as self-organization scaffolds for the attachment of other macromolecular complexes including lamina networks, proteoglycans and cell surface receptors (Khosshnoodi et al., 2006).

The most abundant sources of gelatin are pig skin (46%), bovine hide (29.4%) and pork and cattle bones (23.1%) (Gómez-Guillén, Pérez-Mateos et al., 2009). Fish gelatin accounted for less than 1.5% of total gelatin production in 2007, but this percentage was double that of the market data for 2002, indicating that gelatin production from alternative non-mammalian species had grown in importance (Gómez-Guillén et al., 2011). In the last 10-15 years, the studies about different alternative sources and new functionalities of collagen and gelatin has experienced a boom, in part due to the growing interest in the economical valorization of industrial by-products (from the meat and fish industry), the environmental friendly management of industrial wastes, and the search for innovative processing conditions as well as potential novel applications (Gómez-Guillén et al., 2011).

Meat industry produces considerable quantities of collagen proteins that can be used in foodstuff manufacture because of its water holding properties and ability to form gels (Correa and Lopes, 2013; Mokrejs et al., 2009). These technological properties are closely related to the molecular weight distribution of collagen and also to its charge density, which ultimately defines the organization of the fibres into a helical or disorder structure (Achilli and Mantovani, 2010).

The main attributes that better define the commercial quality of gelatin are gel strength and thermal stability. In order to standardize the gelatin, measurement of gel strength is determined using the so-called Bloom test, which consists of

performing a well defined protocol at a given gelatin concentration (6.67%), temperature (10 °C) and maturation time (17 h), thus allowing gel strength to be expressed in the normalized “bloom value” (Wainwright, 1977). Gel strength is largely dependent on the molecular properties of gelatin, especially with respect to two main factors: the amino acid composition, which is species-specific, and the molecular weight distribution, which results mainly from processing conditions (Gómez-Guillén, 2011; Turnay et al., 2002).

Understanding how collagen behaves and interacts with other elements in its vicinity, constitutes a key factor for interpreting the biochemical and structural phenomena occurred in certain processing stages at the food industry. Given these difficulties, there exists the necessity to create model systems to emulate the collagen surroundings in more complex systems. The most effective method to perform this task is to produce gels constituted by a proper mixture of water and collagen in its denatured form. More specifically, collagen is a biopolymer commonly obtained by an acid or alkaline hydrolysis process. It dissolves in water above its melting temperature and exists as flexible random coils in solution (Guo et al., 2003).

In order to understand the transformation phenomena occurred in these model systems, the innovative technological techniques are required. In this sense, the dielectric spectroscopy constitutes an ideal non-destructive measurement tool to provide fast and accurate information in real time (Castro-Giraldez et al., 2010, 2011, Traffano-Schiffo et al., 2014, Velázquez et al., 2013, 2014).

The permittivity describes the interaction between the any biological system and electric fields, and it is defined by the Gauss's law. The dielectric properties can be defined in terms of the vectorial permittivity, which it is describe as a complex number. (ϵ^*) (Equation 1). The real part of the permittivity is called the dielectric constant (ϵ'), and is related to the ability of the material to store electric energy, following the polarity of the field; whereas the dielectric loss factor (ϵ'') constitutes the imaginary part and is related to the dissipation of the electric energy in other kinds of energies such as the thermal energy.

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j \varepsilon'' \quad (\text{Equation 1})$$

Biological systems are non-ideal dielectrics, so when they are subjected to the influence of an electric field, an energy dissipation phenomena is produced, (Castro-Giráldez et al., 2010), leading to the appearance of different dispersions along the electromagnetic spectrum, being the α , β , and γ - dispersions the most relevant (Schwan, 1957). These dispersions are commonly associated with three relaxation phenomena distributed in three different frequency ranges of the electromagnetic spectrum (Pethig and Kell, 1987). The γ -dispersion is located at high frequencies (900 MHz- 100GHz), whereas β -dispersion appears from few kHz to MHz. Finally, α -dispersion found from few Hz to few kHz.

The γ -dispersion, arising mainly from the orientation in the sense of the electric field polarization and the induction of the dipolar molecule (by its spin). In biological systems the most important molecule is water (Balaguer et al., 2014, Metaxas and Meredith 1983; Nelson, 1991; Thuery, 1991), is associated to the frequency dependence of the aqueous solution where the particles are suspended (Debye, 1929). When an electric field applied to the biological system, the dipolar molecules (water) are bound to orientate themselves with the polarity of the force lines of the electric field (Castro-Giráldez et al., 2010).

The β -dispersion usually occurs in the frequency region from tens of kHz to tens of MHz. This dispersion covers all the mechanisms involved in the orientation of fixed charges in solid surfaces (proteins, carbohydrates), and it could explain complex conformations of these molecules. These charges may belong to the chemical structure of the food or can be produced by the surface tension of the structure matrix. At the higher frequency range of β -dispersion the main interactions are by surface tension charges, this interaction is called Maxwell-Wagner effect. It's associated to colloid structures and it could define the equilibrium levels of colloidal conformations (Feldman et al., 2003; Damezet al., 2007).

The α dispersion is associated to phenomenon of the charge with mobility, soluble or suspended (electrolytes, charges with low

molecular weight and high charge) in liquid phase. One little change in ion movement will produce a dielectric dispersion (Kuang and Nelson, 1997).

The response of a system to an applied external electric field can be described by the conductivity (σ , s/m) and the permittivity (ϵ , in F/m). The conductivity gives a measure of its ability to vibrate the molecules with charge and resonance. Permittivity is often expressed as the relative permittivity ϵ_r (or dielectric constant, dimensionless), which is defined as the permittivity relative to that of vacuum ($\epsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m): $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0$ because the energy in the electric field is either stored or lost, conductivity or permittivity are related. For most substances, the permittivity and conductivity are only constant over a limited frequency range. The typical tendency is for permittivity to decrease, and conductivity to concomitantly increase, in a series of intervals as frequency increases. These changes are called dispersions, and each one reflects the loss of a particular polarization process at specific frequencies. Biological systems show quite large dispersions, especially at low frequencies (Fig.1). These are mainly caused by interfacial polarizations at the surfaces between the different materials of which material is composed (Davey and Kell, 1995; Pethig, 1979; Schwan, 1985).

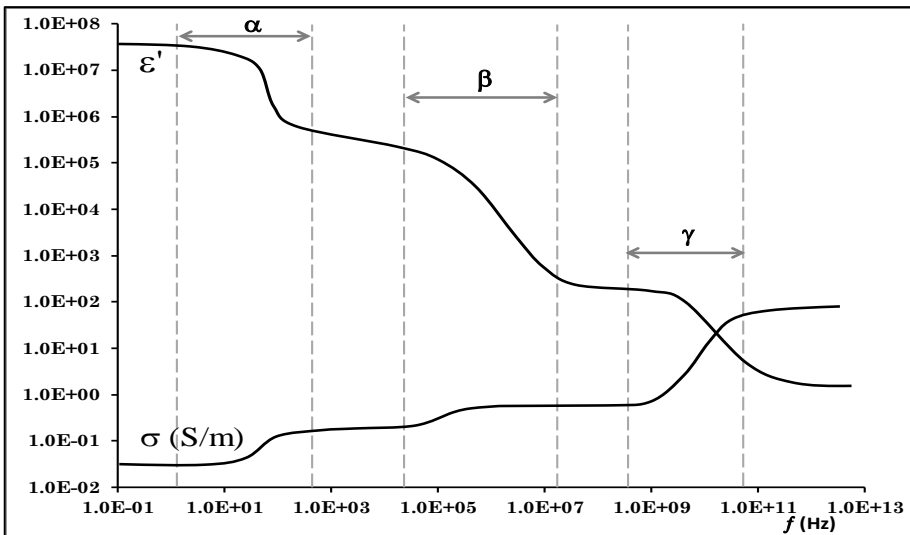


Figure 1 Complex permittivity spectrum of biological materials showing the different dispersion phases at their respective frequency, permittivity and conductivity ranges (adapted from Heileman et al., 2013).

Dielectric properties of a material basically reflect the electric charge movement inside the material in response to an external electric field. For example, dc conductivity of the material represents its free charge movement forced by the external field. Dielectric response of biological materials is always frequency dependent. A linear response means that the dielectric properties are independent of the external field strength, which is true when the external electric field is not very strong.

Currently, there is little scientific information regarding the usefulness of dielectric properties as a system to ensure the control of the quality and composition of collagen. Nevertheless, one important application was studied by Clerjon et al., (2003), who determined the relationship of the dielectric properties as a function of the collagen water activity (a_w). The results obtained demonstrated that six dielectric parameters used in the research were correlated with a_w , sodium chloride and water content. They confirmed the potential efficacy of the dielectric properties as a fast tool for monitoring the quality of the product.

This research constitutes a preliminary study to prove the suitability of the dielectric spectroscopy for monitoring the development of new food structures. To do this, gels of porcine collagen formulated at different concentrations were used. The final objective is to make a leap forward from this model system to more real complex protein systems such as meat and meat products.

2 Materials and methods

2.1 Materials

All the measurements were carried out on collagen gels. The samples were made up with a commercial animal collagen (Edible gelatin, type A, 240°Bloom, from Tradissimo®, Spain), and distilled water.

2.2 Sample preparation

Fifteen samples were prepared with different collagen contents ranged from 9 to 42 % ratio of protein/water. Solution preparation was in three stages. First the collagen lamina was cut and weighed on a precision balance the required quantities of collagen

were mixed with distilled water; a homogeneous solution was formed by heating the dispersion at 70°C under agitation using a magnetic stirrer. Finally, the samples were put in a chamber at 5°C for 30 min prior to measurement.

Fifteen samples were prepared. To dielectric measurements, it was necessary to perform the samples (no more than a disk, 30 mm in diameter and 10 mm in thickness). Before the measurements, all samples were tempered at 25°C.

2.3 Methods

2.3.1 Dielectric measurements

2.3.1.1 Dielectric Properties Measurement by the coaxial probe

For measurements of the dielectric spectra an Agilent 85070E coaxial probe connected to an Agilent E8362B network analyzer was used. The network analyzer measures the frequency range of 500 MHz to 20 GHz. The measurement of dielectric properties at low frequencies is often carried out by means of an Agilent 16451B parallel plates connected to an Agilent 4294A impedance analyzer, using the two rigid metal electrodes contacting method.

2.3.1.2 Dielectric Properties Measurement by the Parallel Plate Fixture

The system used to measure dielectric spectra at low frequencies consists of an Agilent 16451B parallel plate fixture connected to an Agilent 4294A impedance analyser. The electrode B of the fixture, which has a 5 mm guarded/guard electrode, was used. The diameter of the samples used was 30 mm and the thickness was determined individually for each sample with an accuracy of ± 0.01 mm. The thickness of the samples was in the range 5- 7 mm due to the limitations in the slicing system.

The Contacting Electrode Method (Rigid Metal Electrode) was used. This method consists in setting the sample between the electrodes, ensuring good contact between the electrodes and the sample. The dielectric properties were measured by performing an OPEN/SHORT correction.

Dielectric spectra of collagen gels samples were measured and the mean values of three replicates of the collagen gels samples are reported in this article.

The software of the impedance analyzer calculates the capacitance (C_P) and dissipation factor (D). Then the dielectric constant (ϵ') and loss factor (ϵ'') of test material were calculated by using the following equations:

$$\epsilon' = \frac{t_a \times C_P}{\pi \times \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times \epsilon_0} \quad (\text{Equation 2})$$

$$D_t = D = \tan \delta \quad (\text{Equation 3})$$

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (\text{Equation 4})$$

where,

ϵ' : Dielectric constant

D : Dissipation factor

D_t : Dissipation factor of the test material

$\tan \delta$: loss tangent

C_P : Equivalent parallel capacitance (F)

t_a : Sample thickness (m)

d : Diameter of Guarded electrode (m) [$5 \cdot 10^{-3}$ m]

$\epsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12}$ (F m⁻¹)

2.3.1.3 Dielectric Properties Measurement by the sensor

One new system used to measure dielectric spectra at low frequencies consists of a sensor connected to an Agilent 4294A impedance analyzer. The measurement was held directly on the samples i.e. the contacting electrode method was used, ensuring a good contact between the electrodes and the sample. The dielectric properties were measured by performing an OPEN/SHORT correction.

The software of the impedance analyser calculates the capacitance (C_P) and dissipation factor (D). Then the dielectric

constant (ϵ') and loss factor (ϵ'') of test material were calculated by using the equations 2, 3 and 4 previously presented.

2.4 Water activity measurements

Water activity was determined using a dew point hygrometer Decagon Aqualab® brand, model Series3 TE at 25°C (Decagon Devices, Inc., Washington, USA). Equipment accuracy is 0.003. To verify the correct equipment calibration reference solutions were used for the house provided Aqualab®. It is considered that the water activity a_w obtained corresponds to the surface because the measurements were performed without previously disrupted sample.

2.5 Humidity determination

Water content was determined by drying at 98-100°C in partial vacuum having pressure ≤ 25 mmHg, following the AOAC Official method 935.46 (2000), for gelatin.

In addition, pH was measured using a pH-meter (Mettler Toledo®) seven easy, with puncture electrode Inlab® Solids Pro. at 20°C.

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with the Statgraphics Centurion XVI Software (Statgraphics, Virginia, U.S.A.). Statistical analysis was a non-linear regression by using three equations of Gompertz.

3. Results

The transformation that occurs, in a collagen solution (liquid), to gelatine, it is produced by cooling. The only difference between gel formation and viscosity is the temperature at which the system is observed. The viscosity determines the mobility of the molecules in the liquid, whereas the gel firmness primarily describes the structure formed by intermolecular hydrogen bonds (Schrieber and Gareis, 2007). If a gelatine solution is cooled, the mobile molecules aggregate to small clusters; these continuously grow and subsequently form a gel. Therefore these transformations are described by the mobility of the water liquid phase (Vakier et al., 1999) and by the distribution of electric charges of the quaternary

structure of collagen. For this reason a technique able to quantify and describe both phenomena can describe transformations that occur in the collagen gel.

One of the major problems that occur when it is trying to explain the full spectrum of radiofrequency and microwave is the appearance of three dispersions on a very large frequency range with interactions between them. The Debye model is the most common model used to determine the values of relaxation parameters (Kuang and Nelson, 1997), but is tedious to handle and difficult to fit with statistic tools. A powerful sigmoidal model used in biological systems is the Gompertz model (El-Gohary, 2013). The dispersions shown in the dielectric constant spectra, alpha, beta and gamma, are similar to the sigmoidal models before mentioned. Therefore, a mathematical model consisting in three Gompertz equations is proposed, simulating the Debye model. This equation provides the information about the dispersions in radiofrequency and microwave (frequency and dielectric constant of relaxation). The following equation shows the coupling of three Gompertz equations in order to adjust the three dispersions (equation 5):

$$l\varepsilon'(\omega) = l\varepsilon'_{\infty} + \sum_{n=1}^3 \frac{\Delta l\varepsilon'_n}{1 + e^{((l\omega - l\omega_n)^{\alpha_n})}} \quad (\text{Equation. 5})$$

where $l\varepsilon'$ represents the decimal logarithm of the dielectric constant, $l\omega$ represent the decimal logarithm of the angular velocity (obtained from the frequency) and α are the three dispersions slopes. Subscripts ∞ and n represent the minimum value of the dielectric constant and the specific relaxation (α , β or γ), respectively.

Figure 2 shows the average data of dielectric constant and the adjusted Gompertz model for each ratio of protein/water samples assayed. The data were adjusted by using a non-linear regression model of Gompertz, being the minimum correlation coefficient of each triplicate: (0.9982, 0.9982, 0.9984, 0.9966, 0.9990 for 9, 13, 22, 32, 42 P/W, respectively).

In the figure, it is possible to appreciate the three dispersions listed above and the parameters of Gompertz adjust are shown in table 1.

The physical and chemical properties of each gel are shown in table 2, where the electrical conductivity was obtained from the loss factor in the range of MHz.

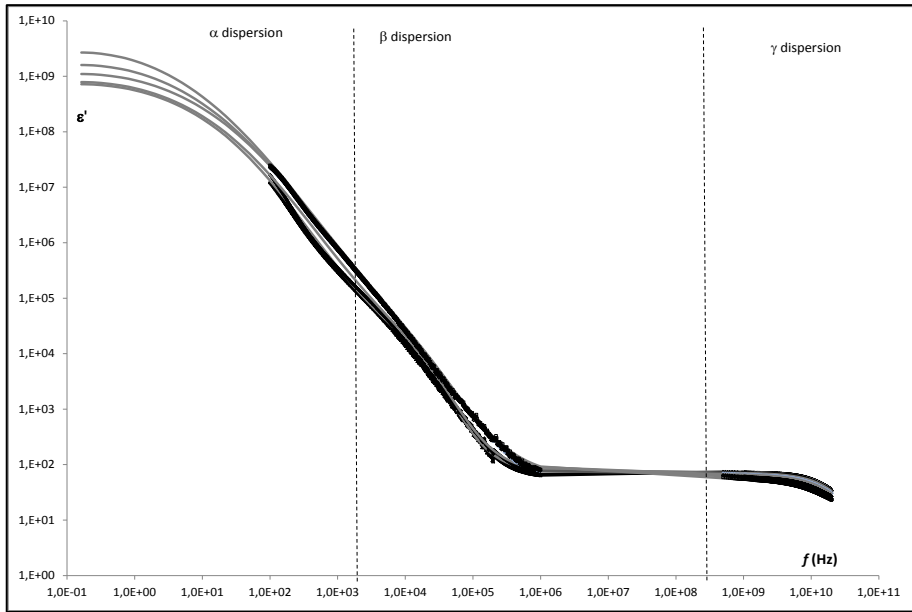


Figure 2. Average data of dielectric constant (♦) and the adjusted Gompertz model (—) for each ratio of protein/water samples assayed.

Table 1. Gompertz parameters of each ratio Protein/water.

P/W	9	13	22	32	42
$ \epsilon_{\infty} $	0,0047 ± 0,0005	0,0011 ± 0,0002	0,0097 ± 0,0004	0,0049 ± 0,0014	0,0019 ± 0,0009
$\Delta\epsilon_{\gamma}$	1,87 ± 0,05	1,85 ± 0,02	1,83 ± 0,05	1,802 ± 0,014	1,773 ± 0,009
$ \omega_{\gamma}$	11,543 ± 0,008	11,55 ± 0,03	11,58 ± 0,02	11,60 ± 0,06	11,63 ± 0,04
α_{γ}	0,157 ± 0,015	0,148 ± 0,004	0,133 ± 0,009	0,117 ± 0,004	0,1001 ± 0,0012
$\Delta\epsilon_{\beta}$	2,20 ± 0,02	2,223 ± 0,011	2,24 ± 0,08	2,40 ± 0,02	2,56 ± 0,03
$ \omega_{\beta}$	5,50 ± 0,02	5,51 ± 0,04	5,61 ± 0,05	5,551 ± 0,004	5,532 ± 0,004
α_{β}	0,285 ± 0,0104	0,249 ± 0,011	0,213 ± 0,013	0,1909 ± 0,0009	0,175 ± 0,002
$\Delta\epsilon_{\alpha}$	6,031 ± 0,012	6,21 ± 0,03	6,57 ± 0,02	7,03 ± 0,02	7,85 ± 0,02
$ \omega_{\alpha}$	2,83 ± 0,08	2,83 ± 0,02	2,83 ± 0,14	2,57 ± 0,04	2,185 ± 0,014
α_{α}	0,169 ± 0,002	0,155 ± 0,004	0,142 ± 0,003	0,137 ± 0,003	0,1298 ± 0,0006

Resultados

Table 2. Physical and chemical properties of collagen gels: pH (-), a_w (-), x_w (kg_w/kg_t), x_p (kg_p/kg_t), σ (S/m).

P/W	9	13	22	32	42
pH	5,28 ± 0,00	5,31 ± 0,01	5,323 ± 0,006	5,35 ± 0,01	5,39 ± 0,014
a_w	0,979 ± 0,003	0,9533 ± 0,0012	0,954 ± 0,003	0,944 ± 0,004	0,912 ± 0,002
x_w	0,91894 ± 0,00013	0,8846 ± 0,0004	0,8175 ± 0,0007	0,7549 ± 0,0005	0,7016 ± 0,0008
x_p	0,08106 ± 0,00013	0,1154 ± 0,0004	0,1825 ± 0,0007	0,2451 ± 0,0005	0,2984 ± 0,0008
σ	3,0438 ± 0,0014	3,533 ± 0,002	4,658 ± 0,004	4,782 ± 0,005	4,909 ± 0,007

Table 3. Relaxation frequencies at each specific dispersion (α , β or γ) for the samples assayed.

P/W	9	13	22	32	42
f_γ (GHz)	18,6 ± 0,7	18 ± 3	16,4 ± 1,8	15 ± 1	13,9 ± 0,8
f_β (kHz)	51 ± 2	51 ± 4	65 ± 7	56,6 ± 0,6	54,2 ± 0,5
f_α (Hz)	107 ± 7	108 ± 5	108 ± 6	59 ± 2	24 ± 0,8

Figure 3 shows the relation between the dielectric constant at relaxation frequency in the range of Hz (show table 3) with regard of protein/water of each sample. In the figure it is possible to appreciate the linear relation between both variables that implies that the α dispersion is directly related with the amount of proteins present in the sample. The liquid phase of a collagen gel dispersed, containing charged amino acids that are dissolved in water, such as proline or glycine (Hudson et al., 1993). Furthermore, depending on the conformational gel level, the reaction temperature, the reaction duration, the pH, etc., the classical electrolytes cross-linkers for gelatine, could stay as a linked of amino acids or in liquid phase, as Al, Cr, Fe or Na (Schrieber and Gareis, 2007). Therefore, the higher protein/water relationships, the greater amount of charged amino acid or electrolytes are found in the liquid phase, increasing the α -dispersion. The P/W ratio increases exponentially, thus the measuring of α -dispersion also grows.

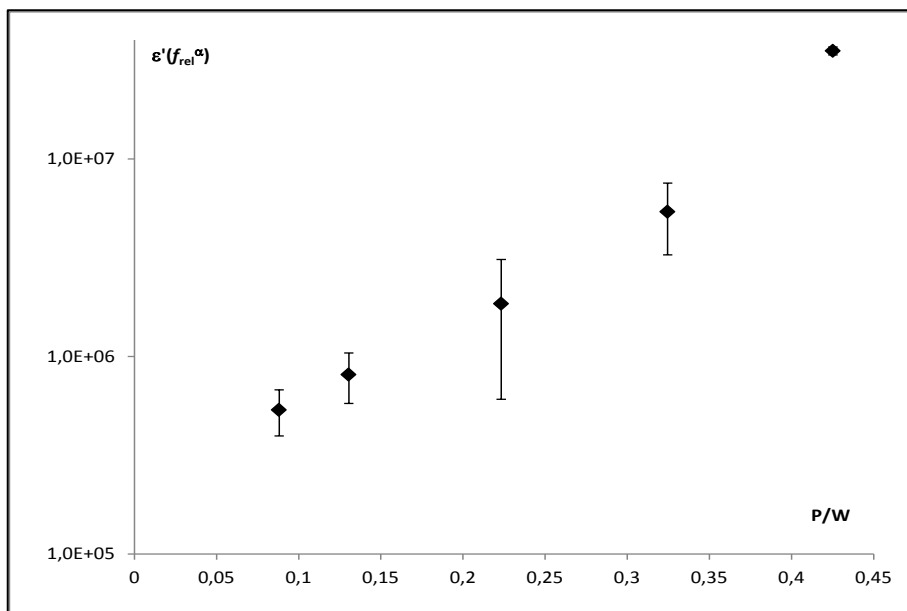


Figure 3. Dielectric constant at relaxation frequency in a dispersion with regard to the ratio of protein/water of each sample.

Figure 4 shows the relation between the dielectric constant at relaxation frequency in the range of kHz (show table 3) with regard to the ratio of protein/water of each sample. The β dispersion is produced by the fixed charges. The basic mechanism of gelatine is related to the reverse coil-to-helix transition triggered by induced changes in ionic strength and pH (Gómez-Guillén et al., 2011). Therefore, the protein conformation is explained by the electric equilibrium between charges, therefore any variation in this dispersion could be explained by the collagen gelatine transition. Gelatine is conforming a gel where the water is the dispersed phase. The structural properties of this gel depend on the conformational structure of the protein, which it is dependent on the distribution of charges in the protein. Any change in the beta dispersion indicates changes in the conformation of the gel. The figure shows two structural states of the gel, first state with more active points of the proteins occupied by water molecules, and the second state with more free charges in the proteins.

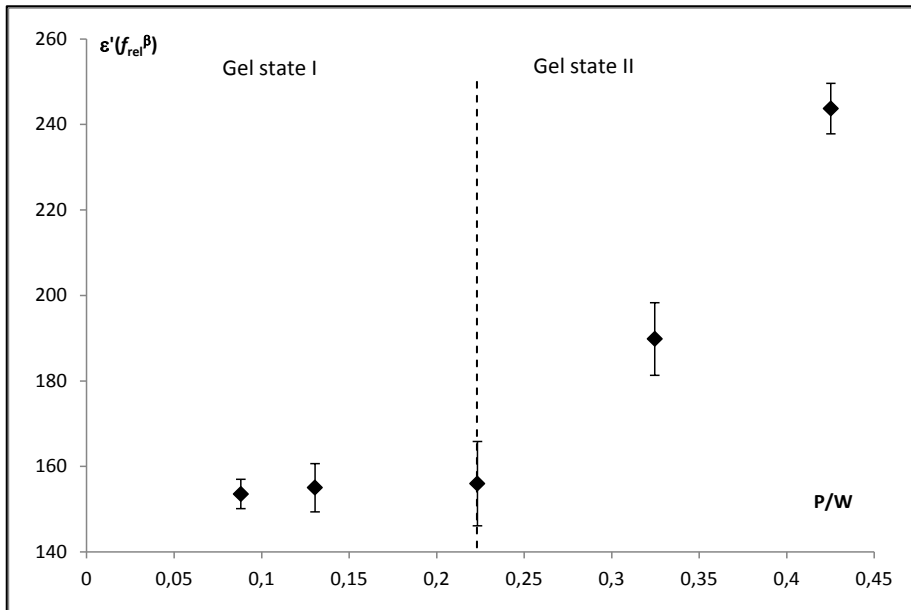


Figure 4. Dielectric constant at relaxation frequency in β dispersion with regard to the ratio of protein/water of each sample.

Figure 5 shows the relation between the conductivity with regard to the pH in the range of MHz. The properties of gelatine-pectin hydrogels have been shown to depend strongly on the pH in the reaction mixture and on the charge balance (determined by the gelatine/pectin ratio), which will influence the degree of electrostatic associations and ionic interactions in the gelling system (Farris et al., 2009). It is known that the water-holding capacity of collagen gelatine increases as pH differs from the isoelectric point, approximately pH 5.3 (Offer & Knight, 1988). This conformational change causes the protein network (gel) which is formed at low pH is more rigid and less elastic than at higher pH (Westphalen et al., 2005). This conformational change caused by change of the ionic strength, ie, the new equilibrium between the charges of the protein, can be observed in Figure 5. In the first state of aggregation, the system has more mobile charges and fixed charges so it has more capacity to vibrate and resonate, having a higher value of conductivity. As can be seen in the value of the β -dispersion and in the conductivity, is possible to

determine whether the gel is in the conformational state I, rigid, or II, elastic (Figures 4 and 5).

The same effect it can be observing in Figure 6, showing the first conformational state and strongly reduces of water activity, reducing the mobility of chemical species found therein, while in the second state the mobility is higher.

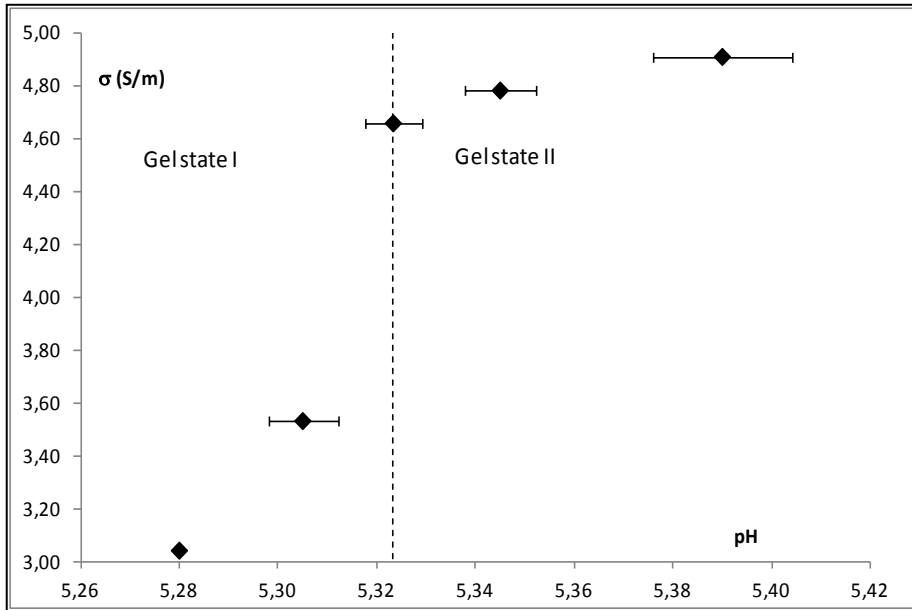


Figure 5. Electric conductivity in the range of MHz with regard to the pH.

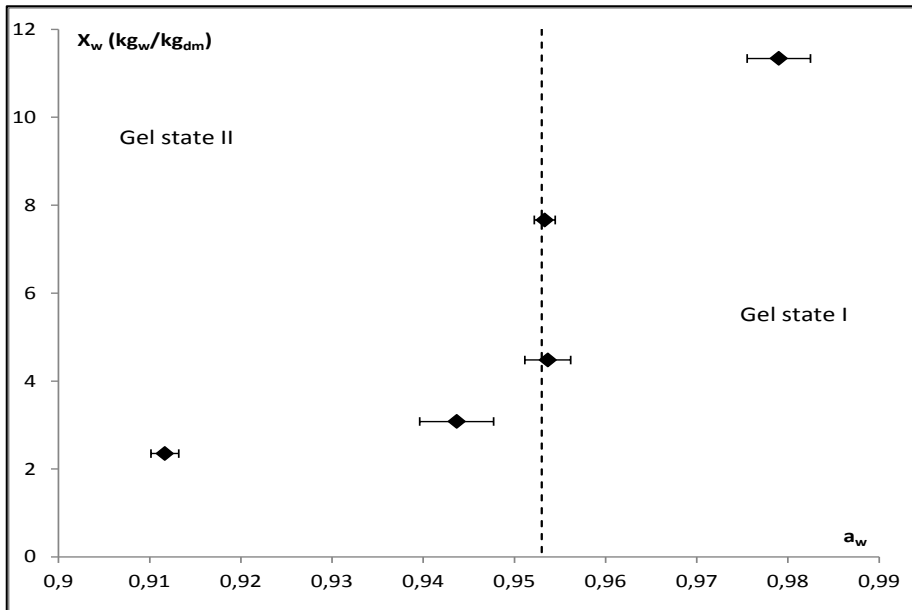


Figura 6. Humidity fraction of protein/water of each sample with regard to the water activity.

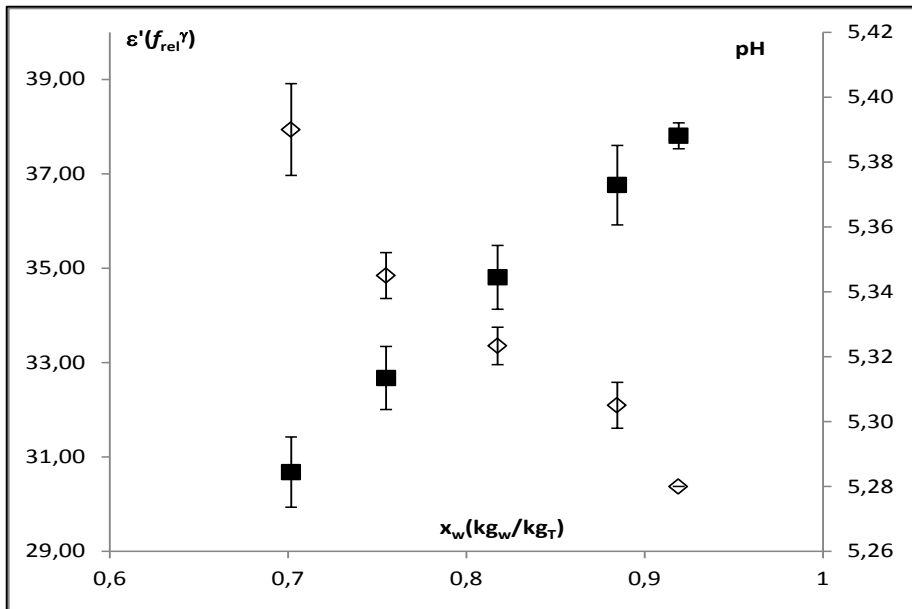


Figure 7. Variation of pH and dielectric constant, with regard to the concentrations, where (◇) correspond to pH and (■) represent dielectric constant (ϵ').

Finally, in figure 7 it can be observe how the γ -dispersion is not affected by the pH, because no exponential changes in the water

content is produced, and only this parameter affects the γ -dispersion.

5 CONCLUSIONS

A coupling of three Gompertz equations has been adjusted in order to determine the three dielectric dispersions described in the frequency range of Hz to GHz, demonstrating the well adjust and the useful and powerful equation.

By using the β -dispersion and the conductivity, is possible to determine the gel is in the conformation: state I rigid, or state II elastic.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación throughout the project AGL2011-30096. The authors acknowledge the financial support from the Universitat Politècnica de Valencia throughout the multidisciplinary project .Author J. Velázquez-Varela thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México for their support.

References

- Achilli, M., & Mantovani, D. (2010). Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: The effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. *Journal of Polymers*, 2, 664-680.
- Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F., & Fito, P. (2010). Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 376-386.
- Clerjon, S., Daudin, J. D., & Damez, J. L. (2003). Water activity and dielectric properties of gels in the frequency range 200 MHz–6 GHz. *Food Chemistry*, 82 (1), 87-97.

Correa, De Moraes, M., & Lopes C. R., (2013). Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. *Food Research International*, 50 (1), 213-223.

Davey, C. L., & Kell, D. B. (1995). The low-frequency dielectric properties of biological cells. In: Waltz, D., Berg, H. & Milazzo, G. (Eds.), *Bioelectrochemistry of cells and tissues*, (pp 159–207). Zürich.

Debye P. (1929). *Polar molecules; Fundamental work presenting the first theoretical model for the orientational relaxation*. Dover Publications, New York.

El-Gohary, A., Alshamrani, A. & Al-Otaibi, A. N. (2013). The generalized Gompertz distribution. *Applied Mathematical Modelling*, 37, (1–2), 13-24.

Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L., & Yam, K. L. (2009). Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(8), pp 316-332.

Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for the development of active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 3-16.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. & Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25,1813-1827.

Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P., & Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36 (26), 9999-10008.

Heileman, K., Daoud, J. & Tabrizian M. (2013). Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue

characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 348–359.

Hudson C. B. (1993) Gelatine—Relating Structure and Chemistry to Functionality. *Food Hydrocolloids.*, pp 347-354

Khosshnoodi, J., Cartailier, J.P., Alvares, K., Veis, A., & Hudson, G. (2006). Molecular recognition in the assembly of collagens: Terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38117-38121.

Kuang, W., & Nelson, S. O. (1997). Low-frequency dielectric dispersion of biological tissues: a review with some new insights. *Transactions of the ASAE*, 41, 173-184.

Lodis f, H., Berk, A., Zipusky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In: W.H Freeman (Eds.). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York.

Metaxas, A. C., & Meredith, R. J. (1983). *Industrial Microwave Heating*. Peter Peregrinus Ltd, London.

Mokrejs, P., Laugmaier, F., Mladek, M., Janacova, D., Kolomaznik, K., & Vasek, V. (2009). Extraction of collagen and gelatine from meat industry by-products for food and non-food uses. *Waste Management & Research*, 27, 31-37.

Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.

Nelson, S. O. (1991). Dielectric properties of agricultural products—Measurements and applications. *IEEE Transactions on Electrical Insulation* 26. 845-869.

Pethig, R. (1979). *Dielectric and electronic properties of biological materials*. John Wiley & Sons (pp 376). New York.

Pethig, R., & Kell, D. B. (1987). The passive electrical properties of biological systems: Their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*, 32, 933–937.

Schrieber R. and Gareis H. *Gelatine (2007) Handbook: Theory and Industrial Practice*. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Chapter 2. Basic Chemical/Physical Principles and Technological Properties. pp 45-68

Schwan, H. P. (1957). Electrical properties of tissues and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics*, 5, 147–209.

Schwan, H. P. (1985). Analysis of dielectric data: Experience gained with biological materials. *Transactions on Electrical Insulation*, 20, 913–22.

Thuery, J. (1991). *Microwaves: Industrial, Scientific and Medical Applications*. Artech House, Boston.

Vakier M.C., Hills, B.P. and Rutledge D.N. (1999) An NMR Relaxation Study of the State of Water in Gelatin Gels. *Journal of Magnetic Resonance* 138, 36–42.

Wainwright, F. W. (1977). Physical tests for gelatin and gelatin products. In A. G. Ward, & A. Coutts (Eds.), *The science and technology of gelatin* (pp. 507-534). New York: Academic Press.

Westphalen A.D., Briggs J.L., Lonergan S.M.(2005) Influence of pH on rheological properties of porcine myofibrillar protein during heat induced gelation. *Meat Science* 70 (2005) 293–299.

5 CONCLUSIONES GENERALES

Se ha demostrado la posibilidad de detectar los cambios composicionales que se producen durante el proceso de fermentación de la malta en condiciones anaerobias a través del uso de la espectroscopia dieléctrica. Por lo tanto, esta técnica se puede utilizar como un método de control rápido, preciso y no destructivo durante la producción de la cerveza.

Se ha desarrollado un modelo termodinámico no lineal para determinar el transporte de agua e iones a través de la estructura del queso, obteniendo un coeficiente fenomenológico de $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2/\text{J s m}^2$. Este modelo describe varios fenómenos que ocurren simultáneamente en el proceso de salado de queso, incluyendo las distintas fuerzas impulsoras, como son los términos eléctricos, mecánicos y de actividad. Se ha demostrado la importancia que tiene el ión calcio en el proceso de salado, no sólo en los cambios estructurales de las proteínas, sino también como impulsor del transporte debido a su papel en la generación del campo eléctrico. También se ha demostrado que el queso sufre fuertes contracciones y expansiones que son transmitidas rápidamente a las fuerzas impulsoras del transporte, lo que conlleva fuertes variaciones en los flujos de masa, especialmente al principio del tratamiento. Además, la deshidratación causa también la pérdida de los componentes nativos de queso, principalmente calcio.

Se ha obtenido un modelo no lineal basado en la constante dieléctrica a 20 GHz que explica, no sólo las pérdidas de agua de la muestra en el volumen de penetración de las microondas (MPV), sino también en toda la muestra, ya que cuando el MPV alcanza el estado estacionario, el modelo predice el flujo de agua. Por otra parte, la conductividad iónica estimada a 500 MHz explica el nivel de salado, y también puede ser explicado para muestras de mayor tamaño, ya que la conductividad está relacionada no sólo con la acumulación de electrolitos, sino también con los flujos. Por lo tanto, el acoplamiento de ambas medidas de propiedades dieléctricas, a 20 GHz y a 500 MHz, puede predecir las especies químicas que intervienen en el proceso de salado de queso, y también los cambios estructurales.

Por último, se han determinado las tres dispersiones que existen en el rango de frecuencias de Hz a GHz en gelatina de colágeno, a través del acoplamiento de tres ecuaciones de Gompertz, demostrándose que existe un buen ajuste, así como la utilidad de la ecuación. Además, ha sido posible determinar el estado conformacional del gel (estado I rígido y estado II elástico), utilizando la dispersión β y la conductividad.

Por lo tanto, se puede concluir que los sensores basados en la espectroscopia dieléctrica son una buena herramienta para la monitorización de algunos procesos de fabricación de la industria alimentaria, desde el punto de vista de la calidad y la seguridad de los mismos.

6 BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C, (2000). A.O.A.C, Association of official analytical chemist official methods of analysis (2000) Washington. D.C.
- Achilli, M. & Mantovani, D. (2010). Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: The effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. *Journal of Polymers*, 2, 664-680.
- Adous, M., Quéffélec, P. & Laguerre, L. (2006). Coaxial/cylindrical transition line for broadband permittivity measurement of civil engineering materials. *Measurement Science and Technology*, 8, 2241-2246.
- Agilent Technologies, (2006). Basics of measuring dielectric materials. Application note, Agilent literature number 5989-2589EN. Agilent Technologies, E.E.U.U.
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*. Springer.
- Aguilera, J.M., & Stanley, D.W. (1999). Food Structuring. In J. M. Aguilera & D.W. Stanley (Eds.), *Microstructural principles of food processing and engineering* (pp. 190-230). Ed. Aspen Publication, Gaithesburg, Maryland.
- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., & Raghavan, V. G. S. (2007). Dielectric properties of butter in the MW frequency range as affected by salt and temperature. *Journal of Food Engineering*, 82 (3), 351-358.

- Aimoto, A. & Matsumoto, T. (1996). Non-invasive method for measuring the electrical properties of deep tissues using an open-ended coaxial probe. *Med. Eng. Phys.*, 18, 641-646.
- Alves Jr., S.L., Herberts, R.A., Hollatz, C., Triche, D., Miletto, L.C., Araujo, P.S., Stambuk, B.U., 2008. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (5), 1494–1501.
- Arntfield, S.D., Murray, E.D., and Ismond, M.A.H. 1990. Dependence of thermal properties as well as network microstructure and rheology on protein concentration for ovalbumin and vicilin. *Journal of texture studies*, 21, 191-212.
- Atkins, P.W. & De Paula, J. (2006). Chemical equilibrium. In P.W. Atkins, & J. De Paula (Eds.), *Physical Chemistry* (pp. 200-240), Oxford University Press, Great Britain.
- Ball, J. A. R., Horsfield, B., Holdem, J. R., Keam, R. B., Holmes, W. S., & Green, A. (1996). Cheese curd permittivity and moisture measurement using a 6-port reflectometer. In *Asia Pacific Microwave Conference*, New Delhi.
- Baroni, A.F., Menezes, M. R., Adell, E.A.A., & Ribeiro, E.P. (2003). Modeling of prato cheese salting: fickian and neural network approaches. In: J. Welti-Chanes, J.F. Velez-Ruiz &

G.V. Barbosa-Canovas (Eds), Transport phenomena in food processing, CRC Press, Boca Raton, USA.

Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribe Larrea, J.L., Guillouet, S.E., 2006. Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2134–3140.

Bircan, C., Barringer, S.A., Mangino, M., 2001. Use of dielectric properties to detect whey protein denaturation. *Journal of Microwave Power EE* 36, 179–186.

Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M., Van Dijck, P., 2007. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 815–824.

Bohigas, X., Tejada, J., 2010. Dielectric characterization of alcoholic beverages and solutions of ethanol in water under microwave radiation in the 1–20 GHz range. *Food Research International* 43, 1607–1613.

Botella Iñigo P. (2008). Estudio de los espectros dieléctricos del lomo de cerdo (*longissimus dorsi*) durante el proceso de maduración. Thesis., Valencia, Spain.: Polytechnic university of valencia.

- Brunton, N.P., Lyng, J.G., Zhang, L., Jacquier, J.C., 2006. The use of dielectric properties and other physical analyses for assessing protein denaturation in beef biceps femoris muscle during cooking from 5 to 85 L C. *Meat Science* 72 (2), 236–244.
- Castritius, S., Kron, A., Schäfer, T., Rädle, M., Harms, D., 2010. Determination of alcohol and extract concentration in beer samples using a combined method of near-infrared (NIR) spectroscopy and refractometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (24), 12634–12641.
- Castro-Giráldez, M. (2010)a. Estudio de los espectros dieléctricos para el control de calidad de alimentos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo.
- Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F., & Fito, P. (2010)b. Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*,11(2), 376-386.
- Castro-Giráldez, M., Botella, P., Toldrá, F., & Fito, P. (2010)c. Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 376-386.
- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Chenoll, C., & Fito, P., (2010)d. Development of a dielectric spectroscopy technique for the determination of apple (Granny Smith) maturity.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11 (4), 749-754.

- Castro-Giráldez, M., Fito, P. J., Dalla Rosa, M., & Fito, P. (2011)a. Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling osmotic dehydration of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12 (4), 623-627.
- Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., & Fito, P. (2010)e. Application of microwaves dielectric spectroscopy for controlling pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 484-490.
- Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Chenoll, C., Fito, P., (2010)f. Development of a dielectric spectroscopy technique for the determination of apple (*Granny Smith*) maturity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (4), 749–754.
- Castro-Giráldez, M. Fito, P.J. Fito P. (2011)c Nonlinear thermodynamic approach to analyze long time osmotic dehydration of parenchymatic apple tissue. *Journal of Food Engineering*, Volume 102, Issue 1, January 2011, Pages 34-42
- Castro-Giráldez, M. Fito, P.J. Fito P. (2010)g. Non-equilibrium thermodynamic approach to analyze the pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering*, Volume 99, Issue 1, July 2010, Pages 24-30

- Castro-Giráldez, M., Tylewicz, U., Fito, P. J., Dalla Rosa, M., & Fito, P. (2011)b. Analysis of chemical and structural changes in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward) through the osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 105 (4), 599-608.
- Cavinato, A.G., Mayes, D.M., Ge, Z., Callis, J.B., 1990. Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 62 (18), 1977–1982.
- Cevoli, C., Ragni, L., Gori A., Berardinelli A., & Fiorenza C. M. (2012). Quality parameter assessment of grated Parmigiano-Reggiano cheese by waveguide spectroscopy. *Journal of food engineering* (113) 201-209.
- Chevalier, D., Ossart, F., & Ghommidh, C. (2006). Development of a nondestructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, 342–347.
- Chew y Sen (1982) Chew, W. C., & Sen, P. N. (1982). Dielectric enhancement due to electrochemical double layer: thin double layer approximation. *The Journal of Chemical Physics*, 77(9), 4683-4693.
- Clerjon, S., Daudin, J. D., & Damez, J. L. (2003). Water activity and dielectric properties of gels in the frequency range 200 MHz–6 GHz. *Food Chemistry*, 82 (1), 87-97.

- Cole, K. S. & Cole, R. H. (1941). Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *The Journal of Chemical Physics*, 9, 341-351
- Collie, C.H., Hasted, J.B. & Ritson, D.M. (1948). The dielectric properties of water and heavy water. *Proceedings of the Royal Society of London*, 60, 145-160.
- Correa de Moraes, M., & Lopes Cunha, R. (2013). Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. *Food Research International*, 50, 213-223.
- Crank, J. (1985). *Mathematics of Diffusions*. Oxford University Press, New York.
- Damez, J.L., Clerjon, S., Abouelkaram, S., Lepetit, J., 2008. Beef meat electrical impedance spectroscopy and anisotropy sensing for non-invasive early assessment of meat ageing. *Journal of Food Engineering* 85, 116–122.
- Datta, A.K., Anantheswaran, R.C., 2001. *Handbook of Microwave Technology for Food Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Davey, C. L., & Kell, D. B. (1995). The low-frequency dielectric properties of biological cells. In: Waltz, D., Berg, H. & Milazzo, G. (Eds.). *Bioelectrochemistry of cells and tissues*. (p 159–207). Zürich.

- De los Reyes, R., Balbastre, J.V., Andres, A., Fito, P., De los Reyes, E., 2009. Monitoring the desalting process of cod using dielectric spectroscopy. *The Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 43 (3), 42–47.
- De Wit, J. N., & Swinkels, G. A. M. (1980). A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin Thermal behaviour at temperatures up to 100°C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*,624 (1), 40-50.
- Debye P. (1929) Polar molecules; Fundamental work presenting the first theoretical model for the orientational relaxation. Dover Publications, New York.
- Demirel, Y. (2002). Chapter 1: Fundamentals of Equilibrium Thermodynamics, and Chapter 11: Thermodynamics and Biological Systems. In Y. Demirel (Ed.), *Nonequilibrium Thermodynamics. Transport and Rate Processes in Physical, Chemical and Biological Systems* (pp. 1-52, and pp. 541-598). Elsevier Science & Technology Books, USA.
- Denny, M., 2009. *The Science of Beer*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Dickinson, E. & Miller, R. (2001). *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Dickinson, E. (1992). *An introduction to food colloids*, (chapter 1). University Press, Oxford.

- Dukhin, S. S., Shilov, V. N., & Bikerman, J. J. (1974). Dielectric Phenomena and Double Layer in Disperse Systems and Polyelectrolytes. *Journal of The Electrochemical Society*, 121(4), 154C-154C.
- Ehrenfest, P. (1933). Phase changes in the ordinary and extended sense classified according to the corresponding singularities of the thermodynamic potential. In *Proc Acad Sci Amsterdam* (Vol. 36, pp. 153-157).
- Everard C.D., Fagan C.C., O'Donnell C.P., O'Callaghan D.J., Lyng J.G. (2006). Dielectric properties of process cheese from 0,3 to 3 GHz. *Journal of food engineering*. (75) 415-422
- Everett, D.W., Rowney M.K., Hickey M.W., & Roupas P. (2004). Salt-induced structural changes in Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation in ripening cheese. *Le Lait. Dairy Science and Technology*, 84, 539-549.
- Fagan, C. C., Everard, C., O'Donnell, C. P., Downey, G., & O'Callaghan, D. J. (2005). Prediction of inorganic salt and moisture content of process cheese using dielectric spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 8 (3), 543-557.
- Fagan, C. C., Everard, C., O'Donnell, C. P., Downey, G., & O'Callaghan, D. J. (2005). Prediction of inorganic salt and moisture content of process cheese using dielectric spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 8, 543-557.

- Fear, E.C., Hagness, S.C., Meaney, P.M., Okoniewski, M. & Stuchly, M.A. (2002). Enhancing breast tumor detection with nearfield imaging. *IEEE Microwave magazine*, 3(1), 48-56.
- Fear, E.C., Meaney, P.M. & Stuchly, M.A. (2003). Microwaves for breast cancer detection. *IEEE Potentials*, 22(1), 12-18.
- Fito, P., Le Maguer, M., Betoret, N., & Fito, P.J., (2008). Advanced food products and process engineering (SAFES) I: concepts and methodology. In G.F. Gutiérrez-López, G.V. Barbosa-Cánovas, J. Welti-Chanes & E. Parada-Arias (Eds.), *Food Engineering Integrated Approaches* (pp. 117–137). Food Engineering Series, Springer, USA.
- Fito, P., LeMaguer, M., Betoret, N., & Fito, P.J. (2007). Advanced food process engineering to model real foods and processes: The “SAFES” methodology. *Journal of Food Engineering*, 83(2), 173-185.
- Fixman, M. (1983). Thin double layer approximation for electrophoresis and dielectric response. *The Journal of Chemical Physics*, 78(3), 1483-1491.
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, C., Tissier, J. P., & Famelart, M. H. (2009). Reducing salt level in food: Part 1. controlled manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *LWT–Food Science and Technology*, 42 (10), 1611–1620.

- Floury, J., Jeanson, S., Aly, S., & Lortal, S. (2010). Determination of the diffusion coefficients of small solutes in cheese: A review. *Dairy Science & Technology*, 90(5), 477-508.
- Floury, J., Rouaud, O., Le Poullennec, M., & Famelart, M.H. (2009). Reducing salt level in food: Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1621-1628.
- Foegeding, E. A. (1988). Thermally induced changes in muscle proteins. *Food Technology*, 23 (6), 58–64.
- Foster, K. R. & Schwan, H. P. (1989). Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review *Crit. Rev. Biomed. Eng*, 17, 25-104
- Foster, K.R. & Schwan, H.P. (1996). Dielectric properties of tissues. In: PolkC, PostowE, editors. *CRC handbook of biological effects of electromagnetic fields*. Boca Raton: Chemical Rubber Co. p 25–102.
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M. & McSweeney P.L. H. (2000). Chapter 13 Cheese rheology and texture (Fundamentals of cheese science). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Fox, P.F. & Cogan, T.M. (2004). Factors that Affect the Quality of Cheese, In: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee (Eds.), *Cheese:*

Bibliografia

- Chemistry, Physics and Microbiology (pp 583-608). Academic Press.
- Fox, P.F., O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., & O'Brien, N.M. (1996). Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. *Advances. Food Nutrition Research*, 39, 163-328.
- Gabriel, C., Gabriel, S., & Corthout, E. (1996). The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in medicine and biology*, 41(11), 2231.
- Gekas, V. (2001). Mass transfer modeling. *Journal of Food Engineering*, 49, 97-102.
- Goy, B., Martin, P. & Leban, J.M. (1992). The measurement of wood density by microwave sensor. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 50,163-166.
- Green, A. D. (1997). Measurements of the dielectric properties of Cheddar cheese. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 32, 16–27.
- Grosse, C., & Foster, K. R. (1987). Permittivity of a suspension of charged spherical particles in electrolyte solution. *Journal of Physical Chemistry*, 91(11), 3073-3076.
- Guinee T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.

- Guinee T. P. & Sutherland B. J. (2011). Salting of cheese. In encyclopedia of dairy sciences second edition, Academic Press Elsevier, London.
- Guinee, T.P. & Fox, P.F. (1986). Transport of sodium chloride and water in Romano cheese slices during brining, *Food Chemistry*, 19(1), 49-64.
- Guinee, T.P. & Fox, P.F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, In: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 207-259) Academic Press, London.
- Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P. & Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36, 9999-10008.
- Hardy, J. (1976). Etude de la diffusion du sel dans les fromages à pâte molle de type camembert. Comparaison du salage à sec et du salage en saumure, Ph.D. Thesis, Université Nancy, France.
- Heileman, K., Daoud, J. & Tabrizian M. (2013). Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 348–359.

Bibliografía

- Held, P. (2010). Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Application Note. BioTek Instruments, Inc..
- Herbert, S., A. Riaublanc, B. Bouchet, D. J. Gallant, & E. Dufour. (1999). Fluorescence spectroscopy investigation of acid- or rennet induced coagulation of milk. *J. Dairy Sci.* 82:2056–2062.
- Herve, A. G., Tang, J., Luedecke, L., & Feng, H. (1998). Dielectric properties of cottage cheese and surface treatment using microwaves. *Journal of Food Engineering*, 37, 309–410.
- Hewlett-Packard, (1992). Basic of measuring the dielectric properties of materials. Application note 1217-1. Hewlett-Packard Company, E.E.U.U.
- Hlaváèová, Z. (2005). Utilization of electric properties of granular and powdery materials. *International agrophysics*, 19(3), 209.
- Hough, J. S. (1996). *The biotechnology of Malting and Brewing*. Cambridge University Press. UK.
- Iñon, F.A., Garrigues, S., De la Guardia, M., 2006. Combination of mid- and near- infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. *Analytica Chimica Acta* 571 (2), 167–174.

- Jespersen, L., Cesar, L.B., Meaden, P.G., & Jakobsen, M. (1999). Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 450–456.
- Jha, S. N., Narsaiah, K., Basediya, A. L. Sharma, R., Jaiswal, P., Kumar. R., & Bhardwaj, R. (2011). Measurements techniques and application of electrical properties for nondestructive quality evaluation of foods—a review. *Journal of food science and technology*, 48(4), 387-411.
- Kaatze, U., Pottel, R. & Schafer, M. (1989). Dielectric spectrum of dimethyl sulfoxide/water mixtures as a function of composition. *The Journal of Physical Chemistry*, 93 (14), 5623-5627.
- Kent, M., Knökel, R., Daschner, F. & Berger, U.K. (2001). Composition of foods including added water using microwave dielectric spectra. *Food Control* 12, 467–482.
- Khosshnoodi, J., Cartailier, J.P, Alvares, K, Veis, A & Hudson, G. (2006). Molecular recognition in the assembly of collagens: Terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38117-38121.
- Komarov, V.; Wang, S., & Tang, J. (2005). Permittivity and measurements. In K. Chang (Ed.), *Encyclopedia of RF and microwave engineering* (3693-3711). John Wiley and Sons, Inc. New York.

- Kraszewski, A.W. & Nelson, S.O. (1990). Study on grain permittivity measurements in free space. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 25(4), 202-210.
- Kuang, W. (1996). Low-frequency dielectric properties of biological tissues: electrical double layer on membranes and ionic conduction through membrane pores. Tesis Doctoral, Universidad de Georgia, Athens, Ga., E.E.U.U.
- Kuang, W., & Nelson, S.O. (1997). Low-frequency dielectric dispersion from ion permeability of membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 193, 242-249.
- Kuang, W., & Nelson, S.O. (1998). Low-frequency dielectric properties of biological tissues: a review with some new insights. *American Society of Agricultural Engineers*, 41(1), 173-184.
- Kubiš, I., Krivanek, I., & Gajdusek, S. (2001). The relationships between the chemical, dielectric and sensory properties of Edam cheese during ripening. *Czech Journal of Food Science* (19) 85–89.
- Labianca, D.A. (1996). Analysis of breath alcohol via infrared spectrophotometry: predicting false ethanol results by application of the base-line method to vapor phase infrared spectra. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34, 59–61.

- Labidi, M., Tahar, J.B., & Choubani, F. (2011). Meta-materials applications in thin-film sensing and sensing liquids properties. *Optics Express* 19 (S4), A733–A739.
- Lachenmeier, D.W. (2007). Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103 (7), 307–311
- Langmuir, D. (1997). Activity coefficients of dissolved species. In Robert McConnin (Ed.), *Aqueous environmental geochemistry* (pp. 123-148). Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Lawrence, R.C., & Gilles, J. (1982). Factors that determine the pH of young Cheddar cheese, *N. Z. J. Dairy Science and Technology*, 17, 1–14.
- Lipkowski, J., & Ross, P. N. (1993). *Structure of electrified interfaces*. VCH Publishers. New York.
- Lodis f, H., Berk, A., Zipusky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J (2000). Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In: W.H Freeman (Eds.). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York.
- Lopez, C., Camier B., & Gassi J.Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17, 235-247.

- Luna, J.A., & Bressan, J.A. (1986). Mass-transfer during brining of Cuartirolo Argentino cheese. *Journal of Food Science*, 51, 829–831.
- Luo, J., Pan, T., Guo, Y., & Ren, F.Z. (2012). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. *Journal of Dairy Science*, 96, 824-831.
- Mamdouh El-Bakry, (2012). Salt in Cheese: A Review. *Current Research in Dairy Sciences*, 4, 1-5.
- Markx, G. H. & Davey, C. L. (1999). The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3), 161-171.
- Martín, P., Moroño, A. & Hodgson, E.R. (2004). Cuarzo KU1 de alta resistencia a la radiación. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 43(2), 452-454.
- Martínez-Navarrete, N., Andrés, A., Chiralt, A., & Fito, P. (2000). *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Servicio de Publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia.
- Martinsen, E. G., Grimnes, S., & Mirtaheri, P. (2000). Non-invasive measurements of post-mortem changes in dielectric properties of handdock muscle—a pilot study. *Journal of Food Engineering*, 43, 189-192.

- Masot R., Alcañiz M., Fuentes A., Schmidt F. C., Barat J.M. Gil L., Baigts D., Martinez-Mañez R. & Soto, J. (2010). Design of low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy
- McGrum, N. G., Read, B. E., & Williams, G. (1991). Polyamides and polyuretanos. *Anelastic and dielectric effects in polymeric solids*. John Wiley & sons. New York.
- McLeod, G., Clelland, K., Tapp, H., Kemsley, E.K., Wilson, R.H., Poulter, G., Coombs, D., & Hewitt, C.J. (2009). A comparison of variate pre-selection methods for use in partial least squares regression: a case study on NIR spectroscopy applied to monitoring beer fermentation. *Journal of Food Engineering* 90, 300–330.
- Metaxas, A. C., & Meredith, R. J. (1993). Industrial microwave heating. IEE Power. Engineering series 4. London, UK: Peter Peregrinus LTD. Metaxas, A. C., & Meredith, R. J. (1993). Industrial microwave heating. IEE Power. Engineering series 4. London, UK: Peter Peregrinus LTD.
- Metaxas, A. C., & R. J. Meredith. (1983). *Industrial Microwave Heating*. Peter Peregrinus Ltd, London.
- Mokrejs, P., Laugmaier, F., Mladek, M., Janacova, D., Kolomaznik, K. & Vasek, V. (2009). Extraction of collagen

- and gelatine from meat industry by-products for food and non-food uses. *Waste Management & Research*, 27, 31-37.
- Mudgett, R.E. (1985). Dielectric Properties of Foods. En R.V. Decareau (Ed.), *Microwaves in the Food Processing Industry* (pp. 15-37), Food Science and Technology, a series of monographs, Academic Press, Inc, Florida, E.E.U.U.
- Muñoz-Pérez, M. (2008). Herramientas de apoyo a la Innovación Tecnológica en las Empresas del Sector Agroalimentario. *Boletín Informativo n°173*, Fundación de Estudios Bursátiles y Financieros.
- Nelson S. O. & Bartley P. G. (2000). Measurement frequency- and temperature-dependent dielectric properties of food materials. *Transactions of the ASAE*, 43, 1733–1736.
- Nelson, S. O. (1973). Microwave dielectric properties of grain and seed. *Transactions of the ASAE*, 16(5), 902-905.
- Nelson, S. O. 1991. Dielectric properties of agricultural products—Measurements and applications. *IEEE Transactions on Electrical Insulation* 26. 845-869.
- Nelson, S. O., & Datta, A. K. (2001). Dielectric properties of FoodMaterials and Electric Field Interactions. In A. K. Datta & R. C. Anantheswaran (Eds.), *Handbook of Microwave Technology for Food Applications* (pp. 69–114). New York: Marcel Dekker.

- Nelson, S.O. & Datta, A.K. (2001). Dielectric properties of Food Materials and Electric Field Interactions. En A.K. Datta, R.C. Anantheswaran (Eds), Handbook of Microwave Technology for Food Applications (pp. 69-114). Marcel Dekker, Nueva York.
- Nesvadba, P., Houska, M., Wolf, W., Gekas, V., Jarvis, D., Sadd, P.A. & Johns A.I. (2004). Database of physical properties of agro-food materials. *Journal of Food Engineering*, 61 497–503.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L., & Stahl, U., (2002). Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEM Yeast Research* 2, 225–232.
- Nicolis, G. & Prigogine, I. (1977a). Self organization in non equilibrium systems from dissipative structures to order through fluctuations, John Wiley and Sons, Inc.
- Nicolis, G. & Prigogine, I. (1977b). Die erforschung des komplexen. auf dem weg zu einem neuen verständnis der naturwissenschaften, R. Piper GmbH and Co. KG. München.
- Nogueira, L.C., Silva, F., Ferreira, I., Trugo, L.C. (2005). Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* 1065, 207–210.

- Nyfors, E., & Vainikainen, P. (1989). Industrial microwave sensors (pp. 207-212). Norwood (MA, USA): Artech House.
- OIV, (2004). Organisation Internationale de la Vigne et du vin. Recueil des Methods Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts. OIV, Paris.
- Olmi, R., Meriakri, V.V., Ignesti, A., Priori, S., & Riminesi, C. (2007). Dielectric spectroscopy of sugar and ethanol solutions in water for monitoring alcoholic fermentation processes. *Journal Microwave Power Electromagnetic Energy* 41 (3), 37–49.
- Onsager, L. (1931). Reciprocal relations in irreversible processes. I. *Physical Review*, 37(4), 405.
- Panteloglou, A.G., Box, W., Smart, K., & Cook, D.J. (2010). Optimization of a small-scale fermentation test to predict the premature yeast flocculation potential of malts. *The Journal of the Institute of Brewing and Distilling* 116 (4), 413–420.
- Payne, M.R., & Morison, K.R. (1999). A multi-component approach to salt and water diffusion in cheese. *International Dairy Journal*, 9, 887–894.
- Peebles, D.M., Edwards, A.D., Wyatt, J.S., Bishop, A.P., Cope, M. & Delpy, D.T. (1992). Changes in human fetal cerebral hemoglobin concentration and oxygenation during labor

measured by near-infrared spectroscopy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 166, 1369-1373.

Pethig R. (1979). *Dielectric and electronic properties of biological materials*. Wiley. New York.

Pethig, R., & Kell, D. B. (1987). The passive electrical properties of biological systems: Their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*, 32, 933–937.

Piddocke, M.P., Kreis, S., Heldt-Hansen, H.P., Nielsen, K.F., & Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (3), 453–464.

Preedy, V.R. (2009). Beer composition and properties. In: Preedy, VR. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, London, pp. 211–367.

Privalov, P. L., & Khechinashvili, N. N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *Journal of molecular biology*, 86(3), 665-684.

Prodan, C., Mayo, F., Claycomb, J. R., Miller Jr, J. H., & Benedik, M. J. (2004). Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions. *Journal of applied physics*, 95(7), 3754-3756.

- Regier, M. & Schubert, H. (2005). Introducing microwave processing of food: principles and technologies. En H. Schubert (Ed.), *Microwave processing of foods* (pp.3-10). GBR: Woodhead Publishing, Cambridge.
- Rigaud, B., Morucci, J. P., & Chauveau, N. (1996). Bioelectrical impedance techniques in medicine. Part I: Bioimpedance measurement. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 24(4-6), 257-351.
- Roos, Y. H., & Roos, Y. H. (1995). *Phase transitions in foods*. Academic Press.
- Ryynänen, S. (1995). The electromagnetic properties of food materials: a review of the basic principles. *Journal of Food Engineering*, 26, 409-429.
- Sato, T., & Buchner, R. (2004). Dielectric relaxation processes in ethanol/water mixtures. *Journal of Physical Chemistry* 108, 5007–5015.
- Sanchís, V., Orive, M. & Ramos, A. J. (2000). *La cerveza. Aspectos microbiológicos*, Universidad de Lleida, Lerida.
- Schwan, H. P., Schwarz, G., Maczuk, J., & Pauly, H. (1962). ON THE LOW-FREQUENCY DIELECTRIC DISPERSION OF COLLOIDAL PARTICLES IN ELECTROLYTE SOLUTION¹. *The Journal of Physical Chemistry*, 66(12), 2626-2635.

- Schwan, H. P. (1957). Electrical properties of tissues and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics*, 5, 147–209.
- Schwan, H. P. (1985). Analysis of dielectric data: Experience gained with biological materials. *Transactions on Electrical Insulation*, 20, 913–22.
- Schwan, H. P. (1988). Dielectric spectroscopy of biological cells. In *Special Issue on Electricity and Biophysics*, T. Mitsui, F. Oosawa, and S. Takashima, guest (Eds.), *Ferroelectrics*. 86:205-223.
- Shiinoki, Y., Motouri, Y. & Ito. K. (1998). On-line Monitoring of Moisture and Salt Contents by the Microwave transmission Method in a Continuous Salted Butter-making Process. *Journal of Food Engineering* (38) 153-167.
- Shukla, T.R. & Anantheswaran, R.C. (2001). Ingredient interactions and product development for microwave heating. En A.K. Datta y R.C. Anantheswaran (Eds.), *Handbook of microwave technology for food applications* (pp. 355-397). Marcel Decker Inc, Nueva York.
- Skierucha, W., Wilczek, A., & Szyplowska, A. (2012). Dielectric spectroscopy in agrophysics. *International Agrophysics*, 26(2), 187-197.
- Slade, L. & Levine, H. (1991). Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the

- assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 115–360
- Smith, G., Duufy, A.P., Shen, J., & Oliff, C.J. (1995). Dielectric relaxation spectroscopy and some applications in the pharmaceutical sciences. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (9), 1029–1044.
- Smith, J., Carr, A., Golding, M., Reid, D., & Zhang, L. (2011). Assessing the use of dielectric spectroscopy to analyse calcium induced compositional and structural changes in a model cheese. Selection of 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). *Procedia Food Science* (1) 1833–1840
- Šmogrovic'ová, D., Dömén, Z. (1999). Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Process Biochemistry* 34 (8), 785–794.
- Sosa-Morales, M. E., Valerio-Junco, L., López-Malo, A., & García, H. S. (2010). Dielectric properties of foods: Reported data in the 21st Century and their potential applications. *LWT – Food Science and Technology*, (8), 1169-1179.
- Stoy, R. D., Foster, K. R. & Schwan, H. P. (1982). *Physics in Medicine and Biology*, 27,(4), 501-513
- Tang, J. (2005). Dielectric properties of foods. In: Schubert, H. (Ed.), *Microwave Processing of Foods*. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, GBR, pp. 22–33.

- Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D., Stassi, P. (1999). Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnology Progress* 15, 105–111.
- Thuery, J. (1991). *Microwaves: Industrial, Scientific and Medical Applications*. Artech House, Boston.
- Trados, T. (2013). *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- Treo, E.F. & Felice, C.J. (2009). Non-linear dielectric spectroscopy of microbiological suspensions. *Biomedical Engineering Online* 8 (19), 1475-925X.
- Turhan, M., & Gunasekaran, S. (1999). Analysis of moisture transfer in White cheese during brining, *Milchwissenschaft*, 54, 446–450.
- Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food chemistry*, 103(2), 404-412.
- Venkatesh, M. S., & Raghavan, G. S. V. (2004). An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, 88 (1), 1-18.
- Venkatesh, M.S. & Raghavan, G.S.V. (2005). An overview of dielectric properties measuring techniques. *Canadian Biosystems Engineering*, 47(7), 15-29.

- Walstra, P., T.J. Geurts, A. Normen, A. Jellema & M. Van Boekel. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia. España.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology* Boca Raton, Florida. USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Wang, S., Tang, J., Johnson, J. A., Mitcham, E., Hansen, J. D., Hallman, G., Drake, S.R. & Wang, Y. (2003). Dielectric Properties of Fruits and Insect Pests as related to Radio Frequency and Microwave Treatments. *Biosystems Engineering*, 85 (2), 201–212.
- Wang, Y., Wig, T.D., Tang, J. & Halberg, L.M. (2003). Dielectric properties of foods relevant to RF and microwave pasteurization and sterilization. *Journal of Food Engineering* 57 (3), 257–268.
- Whitten, K.W., Davis, R.E. & Peck, M.L. (1998). *Química General* 5ª edición, McGraw-Hill. España.
- Wojnarowska, Z., Hawelek, L., Paluch, M., Sawicki, W. & Ngai, K.L. (2011). Molecular dynamics at ambient and elevated pressure of the amorphous pharmaceutical: nonivamide (pelargonic acid vanillylamide). *Journal of Chemical Physics* 134, 1–7.
- Yanniotis, S. & Anifantakis, E. (1983). Diffusion of salt in dry-salted Feta cheese. In R. Jowitt, F. Escher, B. Hallstrom,

H.F.T. Meffert, W.E.L. Spiess, & G. Vos (Eds.), Physical Properties of Foods, Applied Science Publishers, London, UK,.

Zengran, L., Guangyi, Z. & Yunping, S. (2008). Mutagenizing brewing yeast strain for improving fermentation property of beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106 (1), 33–38.

7 ANEXOS



EFFECTO DE DISTINTAS ESPECIES QUÍMICAS EN LAS DISPERSIONES COMPRENDIDAS EN LA RADIOFRECUENCIA MEDIANTE LAS PROPIEDADES DIELECTRICAS

J. Velázquez-Varela, M. Castro-Giráldez, P.J. Fito*

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

*Author for correspondence: Pedro José Fito; pedfisu@tal.upv.es

Abstract

Las propiedades dieléctricas en el rango de las microondas y de radiofrecuencia representan una técnica emergente de control. Esta técnica se puede utilizar para la obtención de información valiosa, sobre las transformaciones que ocurren en los sistemas biológicos cuando se someten a procesos; por ejemplo, en la elaboración de productos alimenticios.

In microwave region, the main interaction is produced with different food constituents and water molecule.

ABSTRACT

The coagulation of milk during the cheesemaking is an important step to determine the optimal time to cut curd, this process involves several stages and different biochemical transformations of the milk. The milk coagulation properties are relevant principally because they information about these production. Therefore, optimizing the coagulation time is complex due to the difficulty of controlling the changes in the colloidal system. A thermodynamic model has been developed to describe and to measure the structural changes (chemical, physical and conformational) through the milk coagulation process by applying the irreversible thermodynamics in unsteady state, and also by using the surface water activity, mass variation and dielectric properties. It has been related the potentials of the chemical compounds in milk with the phenomenological coefficients that describe the structural changes. It has been demonstrated that the dielectric properties are a good tool to control the milk coagulation process during cheese production.

Keywords: Coagulation, gel, curd, dielectric spectroscopy, thermodynamic.

INTRODUCTION

Until now, there have been many studies involving measurements in cheesemaking, with the aim of forming a better understanding of the underlying mechanisms which cause the coagulation milk. The milk coagulation properties analysis is made with a variety of methodologies, and using different instruments. The measurements have been led to an approach to understand the mechanisms underlying milk coagulation. Such studies have been focused in mechanical and optical measurements among others.

Nonetheless the complexity of the mechanisms involved in the process of milk coagulation is no clear due to milk components, the coagulation of milk is the first phase in cheese-making that affects the cheese quality. The casein micelles aggregate form a three-dimensional network as a result of casein micelle fusion, the nature of the forces of attraction during the aggregation of casein micelles is not yet completely clear, although van der Waals forces, Ca^{2+} bridges, and hydrophobic interactions appear to be involved.

Milk coagulation properties (MCP) are traditionally expressed using rennet coagulation time (RCT), time to curd firmness (CF) of 20 mm (K_{20}), and CF 30 min after enzyme addition (a_{30}) values. The evaluation and acquisition of data required a way fast and efficient, which enables a fast response to control dynamic parameters in the product being required.

Between the physical properties of the foods systems is necessary to introduce non-invasive, non-destructive, faster, accurate and reliable on-line control methods in order to know the physics properties related to the coagulation phase. So the dielectric spectroscopy is a tool to succeed this challenge.

The dielectric spectroscopy is based on microwave radiation and it allows studying the relaxation phenomena in a large interval of frequencies (500 MHz-20 GHz). The complex permittivity is the dielectric property that describes the behavior of the material under the influence of an electric field (Metaxas and Meredith, 1993). The two components of the complex permittivity are influenced by many factors such as the frequency, the temperature and water content, among several others.

The aim of this work was to studying the coagulation phase with the dielectric properties, designing an on line non-destructive system for monitoring process at industry.

In the figure 2, it can be observed that the addition of $CaCl_2$ produce a decrease in dielectric constant and loss factor spectra with regard to dielectric spectra of pure water at dipolar dispersion frequencies. This effect is due to the fact that $CaCl_2$ molecules can form hydrogen bonds with water dipoles, limiting its movement and decreasing its polarization capacity. For this reason, dipolar dispersion is displaced to minor frequencies of the spectrum, decreasing dipolar relaxation frequency.

The dielectric spectra of sample were measured during the coagulation phase at different times in order to analyze if the compositional changes can be detected by dielectric spectroscopy (figure 2 and 3). Moreover, it was studied at frequencies of 15 and 20 GHz (figure 4 and 5 respectively), to analyze the differences in the loss factor a these frequencies in the zone of dipolar dispersion.

The response of the sample to microwave radiation is related by its permittivity, in the milk the major chemical constituent is water, it's a strongly polar solvent, moreover the milk contains free ions who contribute to the dielectric loss spectra manly influenced by the ion conductivity a low frequencies.

In the figures 2 and 3 it can be observed the evolution of dielectric spectra in the microwave region for coagulation milk, there are differences in the spectra and there are analyzed some punctual frequencies (figure 4 and 5) in order to determine if the differences in coagulation milk process were significant. In both figures 4 and 5, its possible to appreciate that at high frequencies the loss factor was more useful to determine the coagulation phenomenon.

MATERIAL & METHODS

(see Figure 1)

Raw material. Experiments were done using commercial whole milk, (Puleva®), $CaCl_2$ and comercial rennet

Experiment Assays of whole fluid milk (100mL) were prepared, with 0.02% (w/w) of $CaCl_2$ added stirring for 1 min to assure uniform distribution, subsequently commercial rennet (laboratorio Arroyo® 1:10.000) was added into the milk glass baker and stirring for 3 min to ensure an uniform distribution. The glass beaker was placed in the water bath set a same temperature (40°C) during the coagulation phase. Data acquisition was initiated upon addition of rennet, because $CaCl_2$ and rennet concentration are the crucial factors that affecting the milk coagulation.

Dielectric measurements were made using an Agilent 85070E open-ended coaxial probe at high temperature connected to an Agilent E8362B vector network analyzer (Agilent Technologies, EEUU). The system was calibrated using three known standards air, a shorting block and Milli-Q water at 40°C. Measurements were taken in sets of every five minutes until coagulation, recording both the dielectric constant and the dielectric loss factor.

Measurements.

- **Dielectric properties.** Coaxial probe Agilent 85070E connected to a network analyser Agilent E8362B.
- a_w Hydrometer (Decagon model Aqualab CX-2, ± 0.003)

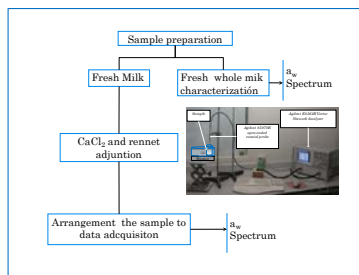


Figure 1. Measurement of milk samples dielectric properties with an Agilent 85070E open-ended coaxial probe connected to an Agilent E8362B Vector Network Analyzer.

RESULTS

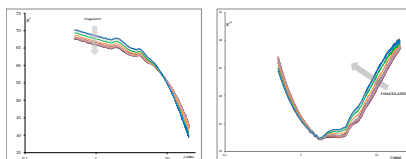


Figure 2. Dielectric constants spectra through coagulation milk.

Figure 3. Loss factor spectra through coagulation milk.

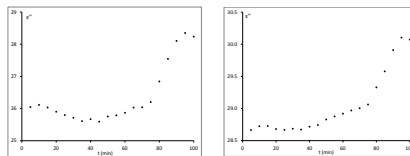


Figure 4. Loss factor spectra through coagulation milk to 15 GHz frequency.

Figure 5. Loss factor spectra through coagulation milk to 20 GHz frequency.

It has been demonstrated that the dielectric properties are a good tool to determine the optimum level of coagulation milk, nonetheless future is need studies on the radio frequency to acquire more data over the interactions the principal components a different dispersions α and β .

