



Trabajo Fin de Máster en

Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Influencia de la anchura de pulso en la extracción de betanina de remolacha roja
mediante pulsos eléctricos de alto voltaje

Influence of pulse width in the extraction of betanin by pulsed electric fields from
beetroot

Autor/es

Cristina Millán Silgado

Director/es

Dr. Javier Raso Pueyo
Dr. Guillermo Saldaña Navarro

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

1.Resumen	3
2.Summary	4
3.Introducción	5
3.1 Colorantes alimentarios	5
3.1.1 Betalaínas de la remolacha roja	6
3.2 Transferencia de masa en la industria alimentaria.	8
3.2.1. Extracción sólido-líquido o lixiviación	9
3.3. Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)	11
3.3.1. Fundamento de los PEAV	11
3.3.2. Parámetros de proceso	12
3.3.2.1. Intensidad de campo eléctrico	12
3.3.2.2. Tiempo de tratamiento	12
3.3.2.3. Energía por pulso	13
3.3.2.4. Frecuencia	13
3.3.2.5. Resistencia de la cámara de tratamiento	14
3.4. Aplicación de los PEAV en procesos de extracción	
4.Materiales y métodos	15
4.1 Materias primas, reactivos, instrumental y equipos	15
4.1.1 Materia prima	15
4.1.2 Reactivos	16
4.1.3 Instrumental y equipos	16
4.2 Extracción de la betanina de la remolacha roja	17
4.2.1 Influencia de la conductividad del medio de tratamiento y de la temperatura en el efecto de los PEAV	17
4.2.2 Cuantificación de betanina	18
4.3 Equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje	19
4.3.1 Parámetros utilizados en el tratamiento por PEAV	20
4.3.2 Influencia de la conductividad del medio de tratamiento y de la temperatura en el efecto de los PEAV	21
4.4 Análisis de textura de la remolacha roja	22
4.5 Modelización matemática de la cinética de extracción	23

4.6 Análisis estadístico de los datos	24
5. Resultados y discusión	25
5.1 Influencia del campo eléctrico	26
5.2 Influencia del tiempo de tratamiento	27
5.3 Influencia de la anchura de pulso	28
5.4 Cinética de extracción de la betanina de la remolacha roja	29
5.5 Influencia de la conductividad y temperatura del medio de tratamiento en la mejora de la extracción de betanina por tratada por PEAV	36
5.6 Influencia del tratamiento de PEAV en la fuerza requerida para cortar la remolacha roja	38
6. Conclusiones	40
6. Conclusions	41
7. Bibliografía	42

1. RESUMEN

En esta investigación, se ha evaluado por primera vez, la mejora de la extracción de betanina de remolacha roja mediante la aplicación previa al proceso de extracción de tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) a la remolacha entera. Se ha estudiado la influencia de la intensidad del campo eléctrico (0,5, 1 y 1,5 kV/cm), el tiempo de tratamiento (1000 y 100 μ s) y la anchura del pulso (5, 25 y 50 μ s) en la electroporación de las células de la remolacha por tratamientos de PEAV.

Las gráficas de extracción se describieron por un modelo matemático que asume la existencia de dos etapas en el proceso de salida de la betanina de la remolacha: una etapa de lavado y una etapa de difusión. En todos los casos, tanto la velocidad de la etapa de lavado, como la cantidad total de betanina extraída en esta etapa fueron mayores que en la etapa de difusión.

La extracción total de betanina fue función de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento, mientras que tras la aplicación de un tiempo de tratamiento de PEAV determinado, la anchura de pulso no afectó a la eficacia del proceso.

La cantidad total de betanina extraída incrementó un 40, 57, 36 y 49% respecto a la muestra control tras electroporar la remolacha con 0,5 kV/cm durante 1000 μ s, 1 kV/cm durante 1000 μ s, 1 kV/cm durante 100 μ s y 1,5 kV/cm durante 100 μ s respectivamente. Aunque con el tratamiento de 1,5 kV/cm durante 100 μ s se extrajo un 10% menos de betanina, la reducción de 10 veces en el tiempo de tratamiento y de 3,6 veces en la energía requerida para aplicar el tratamiento provoca que éste sea el más adecuado en un proceso industrial.

Aunque a menor temperatura de tratamiento y menor conductividad del medio de tratamiento el efecto de los PEAV en la extracción de betanina fue menor, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

El tratamiento de 1,5 kV/cm durante 100 μ s redujo la fuerza de corte de la remolacha a la mitad respecto a la remolacha sin tratar y 1,3 veces respecto a la remolacha tratada a 1 kV/cm durante 1000 μ s por lo que estos resultados confirman que este tratamiento sería el más adecuado industrialmente.

2. SUMMARY

The enhancement in the extraction of red beetroot betanin by application of Pulsed Electric Fields (PEF) to the entire beetroot has been investigated. The influence of the electric field (0.5, 1 y 1.5 kV/cm), treatment time (1000 y 100 μ s) and the pulse width (5, 25 y 50 μ s) in the electroporation of beetroot cells by PEF has been studied.

The extraction graphs were described using a mathematical model assuming the existence of two different stages in the liberation of the betanin from beetroot: a washing stage and a diffusion stage. In all the cases, both the velocity of the washing stage, as well as the total quantity of the extracted beetroot were higher than in the diffusion stage.

The total extraction of beetroot was based on the electric field and the total treatment time, being not the case of the pulse width, which did not influence in the extraction process.

The total quantity of the extracted betanin increased 40, 57,36 and 49 % regarding to the untreated beetroot when the beetroot was treated with 0.5 Kv/cm for 1000 μ s, 1kV/cm for 1000 μ s, 1kV/cm for 100 μ s and 1.5 kV/cm for 100 μ s, respectively. Although with the treatment of 1.5 kV/cm 100 μ s, 10% less of betanin was extracted, a 10 fold reduction in the treatment time and 3.6 fold in the energy required to apply the treatment, makes that this concretely treatment is the most suitable for an industrial process.

Although the extraction was lower, with a lower treatment temperature and a lower conductivity of the treatment medium, differences observed were not statistically significant.

A Treatment of 1.5 kV / cm for 100 μ s reduced the cutting strength of the beetroot by half compared to the untreated beetroot and 1.3 fold respect to the beetroot treated 1kV/cm for 1000 μ s, then these results confirm that this treatment would be the most appropriate industrially.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. COLORANTES ALIMENTARIOS.

Los alimentos naturales tienen su propio color, por lo que en principio parecería adecuado mantenerlo a lo largo del proceso de transformación. Sin embargo, los consumidores prefieren, en determinados alimentos, un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación de un producto. La variabilidad natural de las materias primas hace que este color normalizado sólo pueda obtenerse modificándolo de forma artificial. Por otra parte, muchas sustancias colorantes naturales de los alimentos son muy sensibles a los tratamientos utilizados en el procesado (calor, acidez, luz, conservantes, etc.), por lo que deben sustituirse por otras más estables.

En un principio, la industria alimentaria utilizó colorantes naturales, pero a raíz del desarrollo de la industria de colorantes artificiales, estos supieron en gran medida a los naturales. Sin embargo, en los últimos años, la preocupación por la seguridad de los alimentos, las limitaciones impuestas por las legislaciones, los problemas sanitarios que provocan (hipersensibilidades, reacciones de intolerancia, etc.) y la presión del consumidor, que cada vez más, muestra más rechazo frente a los pigmentos sintéticos, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales (Noonan y Meggos, 1980). Por lo que, actualmente existe una gran demanda de productos naturales por parte de los consumidores, por su capacidad como colorante y por su buen impacto para el cuerpo humano (Loginova et al., 2011).

Los colorantes naturales suelen clasificarse por su origen animal, vegetal o mineral, siendo los dos primeros grupos los más importantes. El mayor representante de los colorantes de origen animal es la cochinilla. De los segundos, los principales pigmentos de los que se obtienen los colorantes naturales son las clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalaínas. Las clorofilas y los carotenoides son insolubles en agua, mientras que los flavonoides y las betalaínas son pigmentos solubles en agua y se localizan en el interior de las vacuolas así como en el citoplasma de las células vegetales. Estos colorantes, para su uso alimentario, se extraen con agua o con solventes orgánicos, dependiendo de su solubilidad (Henry, 1992).

En el código europeo de colorantes, se utiliza la letra E seguida de un número asignado a cada colorante para clasificarlos, siendo algunos de los más importantes del grupo de origen vegetal los que se muestran en la Tabla 2.1, que corresponden a pigmentos naturales utilizados como colorantes entre los que se encuentran las betaninas o betalainas (R.D. 1465/2009).

Tabla 1. Pigmentos naturales de origen vegetal utilizados como colorantes alimentarios.

Pigmento	número E
Curcumina	E-100
Clorofilas	E-140
Clorofilinas	E-141
Caramelo	E-150
Carbón vegetal	E-153
Carotenoides	E-160
Xantofilas	E-161
Betaninas	E-162
Antocianos	E-163

3.1.1 Betalainas de la remolacha roja

La remolacha roja es la raíz comestible del cultivo *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (conditiva), se cultiva ampliamente a lo largo de América, Europa y Asia. Esta remolacha, al igual que la remolacha azucarera, pertenece a la familia de las Quenopodiáceas, y están disponibles para su consumo durante todo el año, ya que durante el invierno se producen en las regiones del norte, centro y levante de España, y en primavera y en verano su producción se centra en la zona de Andalucía, siendo Francia e Italia los países productores más importantes de Europa.

La remolacha roja, además de ser de gran interés para la producción de colorante natural, ha recibido especial atención debido a sus posibles efectos sobre la salud para las personas, especialmente por su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Pero su uso principal en la industria alimentaria es la producción de colorante natural, a diferencia

de la remolacha azucarera la cual se destina a la producción de azúcar (Wruss et al., 2015).

La familia de las betalaínas representa el principal pigmento en la remolacha roja produciendo una coloración roja-violeta característica, que supone el mayor atributo de calidad y aceptabilidad (Paciulli et al., 2016). Tanto las semillas, las raíces y las hojas de la remolacha roja son ricas en polifenoles y en estos grupos de pigmentos nitrogenados solubles en agua. Morfológicamente, la raíz de la remolacha roja cortada transversalmente presenta una serie de anillos en los que se pueden observar diferentes tonalidades de color del pigmento que producen las betalaínas.

De manera que, las betalaínas son pigmentos vacuolares formados por el ácido betalámico, un pigmento que contiene nitrógeno en su estructura (Khan, 2016) (Figura 3.1.1). Se trata de colorantes hidrofílicos que contienen el cromóforo ácido betalámico, subdivididos en las betacianinas, las cuales pueden ser glucosiladas y fuertemente acetiladas, y en las betaxantinas, aminoácidos derivados del ácido betalámico (Khan y Giridhar, 2014). Las betalaínas se pueden subdividir en dos clases diferentes, que son las betacianinas (color rojo-violeta) y las betaxantinas (color amarillo-anaranjado), siendo las betaninas las más comunes en el reino de las plantas entre las betacianinas (Gengatharan et al. , 2015).

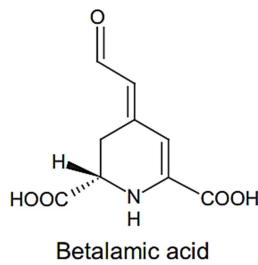


Figura 1. Estructura del ácido betalámico (Khan, 2016)

De manera similar a otros pigmentos, las betalaínas son muy sensibles a la degradación tanto por el calor, la luz, las enzimas, el oxígeno y el pH, parámetros que pueden influir en la decoloración del pigmento (Paciulli et al., 2016). De hecho, el uso de los colorantes artificiales compite con las betalaínas como colorante debido a su baja estabilidad (Khan, 2016).

La remolacha roja es la única fuente de betalaína (E-162) aprobada en los Estados Unidos y en la Unión Europea como aditivo alimentario, utilizándose como un colorante natural en la industria alimentaria para alimentos poco ácidos en forma de remolacha deshidratada (remolacha en polvo) (Paciulli et al., 2016). También se encuentra en la sección 73.40 en el capítulo 21 del CFR (Code of Federal Regulations), de la FDA (Food and Drug Administration) en USA (Khan, 2016). Éste colorante se comercializa con el nombre de “rojo de remolacha” o “betanina” (RDL 2001/1995, de 7 de diciembre). El colorante está formado por diferentes pigmentos pertenecientes a la clase de la betalaina. El principal colorante consiste en betacianinas (rojo) de las que la betanina supone el 75-95 %. Pueden estar presentes pequeñas cantidades de betaxantina (amarillo) y productos de degradación de las betalainas (marrón claro). La solución puede concentrarse y algunos productos pueden refinarse a fin de eliminar la mayoría de los azúcares, sales y proteínas (RDL1465/2009, de 18 de septiembre).

Actualmente, el uso de la remolacha roja está muy extendido industrialmente en la producción de colorante en forma de zumos, concentrados y en polvo. Tiene mucha aplicación en la elaboración de productos lácteos (yogures), en rellenos de frutas, pastelería (preparados para pastel, postres de gelatina), sustitutos de carne, dulces (caramelos, malvaviscos), helados, salsas y refrescos (Loginova et al., 2011; Khan, 2016), y, en la mayoría de las aplicaciones como colorante de alimentos, una cantidad estimada de menos de 50 mg betanina/kg podría producir la coloración deseada (Khan, 2016).

3.2. TRANSFERENCIA DE MASA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

La extracción de componentes intracelulares es un proceso de transferencia de masa en el que un determinado componente presente en una fase es liberado a una segunda fase como consecuencia de un gradiente de presión o concentración entre ellas, con el objetivo final de la obtención de una determinada sustancia. La velocidad de extracción depende del gradiente entre las fases y de la resistencia que encuentran las moléculas para migrar de una fase a la otra (Aguilera y Stanley, 1999). Esta resistencia depende, fundamentalmente, de las características del medio a través del cual el componente se transfiere, así como de cualquier tipo de interacción entre el componente y el propio medio (De Dios Alvarado y Aguilera, 2001). Generalmente, la industria alimentaria requiere que la velocidad de la transferencia de masa sea lo más alta posible con objeto

de acelerar el proceso. Ello aumenta la productividad y minimiza la pérdida de calidad del alimento o de la sustancia que se transfiere. En muchos casos, la sustancia de interés se encuentra en el interior celular por lo que es necesario que atraviese las envolturas celulares para su obtención. Estas envolturas dificultan enormemente los fenómenos de transferencia de masa, es por ello que, cuando estas envolturas se desnaturalizan o permeabilizan, la resistencia que ofrecen las membranas celulares al paso de solutos disminuye drásticamente. Para incrementar la permeabilidad de las membranas celulares, en algunos procesos industriales, los tejidos se suelen someter a un tratamiento térmico o enzimático previo (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997; Sacchi et al., 2005). La aplicación de estos tratamientos presenta algunos inconvenientes, como un mayor coste energético del proceso o una liberación de sustancias indeseables al líquido de extracción si la desnaturalización de las paredes celulares es muy intensa (Eshtiaghi y Knorr, 2002; Bouzrara y Vorobiev, 2000). Además, la termosensibilidad de algunas de las sustancias limita la aplicación del calor para mejorar la extracción (Cacace y Mazza, 2003).

Son muy diversos los procesos de transferencia de masa que se producen en la industria alimentaria como la deshidratación, la extracción por presión, el curado y marinado, etc.; siendo uno de los más típicos la extracción sólido-líquido o lixiviación.

3.2.1. Extracción sólido-líquido o lixiviación.

El paso de componentes que generalmente se encuentran en el interior de las células de una matriz sólida a un solvente acuoso u orgánico es un fenómeno de transferencia de masa que se conoce con el nombre de extracción sólido-líquido o lixiviación. En este proceso, el solvente se mezcla íntimamente con el sólido y el contacto se mantiene durante el tiempo requerido. Transcurrido este tiempo, la mezcla se divide en dos partes: una líquida compuesta por la disolución del soluto en el disolvente y otra formada por el residuo constituida por los componentes sólidos insolubles y parte del solvente embebido en ellos. Algunos de los procesos de extracción sólido-líquido de mayor relevancia en la industria alimentaria ocurren en el proceso de obtención de la sacarosa, en la elaboración del vino tinto o la extracción de colorantes de origen vegetal.

Se considera que la extracción de un soluto que se encuentra en el interior de una matriz sólida ocurre en tres etapas. Primero, el soluto que se encuentra en la superficie de la fase sólida se disuelve en el disolvente; posteriormente, el soluto difunde desde el

interior hasta la superficie de la partícula sólida; y, finalmente, migra desde la superficie al seno del disolvente. En un principio, cualquiera de las tres etapas puede resultar limitante de la velocidad de extracción. La velocidad del movimiento del soluto en la matriz sólida es muy difícil de cuantificar, debido a lo complejo de la estructura de la mayoría de los alimentos. Normalmente, en los procesos de lixiviación, la disolución se aproxima a la saturación a un ritmo exponencial. Entre los factores que influyen en la velocidad de extracción se encuentran:

- *Tamaño de partícula.* La velocidad de transferencia de masa desde la superficie del sólido es directamente proporcional al área. Por lo tanto, la reducción del tamaño de partícula aumenta la velocidad de extracción, debido al aumento del área y a la reducción de la distancia que el soluto tiene que recorrer en el interior del sólido para alcanzar la superficie.
- *Gradiente de concentración.* El gradiente de concentración entre la superficie del sólido y la disolución tiene una notable influencia en la velocidad de extracción. El solvente a utilizar debe permitir la disolución del soluto a extraer y debe tener una viscosidad lo suficientemente baja para que circule fácilmente a través del lecho del sólido.
- *Temperatura.* El incremento de la temperatura aumenta, generalmente, tanto la velocidad de disolución del soluto en el disolvente, como la velocidad de difusión del soluto a través de la disolución. Por lo tanto, aumenta la velocidad de extracción. Sin embargo, algunos productos requieren que la temperatura no sobrepase un determinado valor pues se podría ver afectada su calidad.
- *Velocidad de flujo del disolvente.* En general, cuanto más alta la velocidad y más turbulento sea el flujo del disolvente sobre la superficie de la matriz sólida, mayor es la velocidad de extracción. Cuando se extrae un soluto de una matriz finamente dividida se suele recurrir a la agitación mecánica.

En las últimas décadas, ha surgido un gran interés por la mejora de los procesos de transferencia de masa. El objetivo es conseguir acelerar el proceso afectando lo menos posible a las propiedades de las matrices alimenticias. Entre las tecnologías propuestas para conseguir este propósito, se puede destacar el calentamiento mediante microondas, los ultrasonidos, el uso de fluidos supercríticos y los pulsos eléctricos de

alto voltaje (Bouzrara y Vorobiev, 2001; Raso y Heinz, 2006; Kazaki et al., 2007; Yu et al., 2007; Vilkhu y col., 2007).

3.3. LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)

3.3.1. Fundamento de los PEAV

La tecnología de PEAV consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (1-50 kV/cm) y corta duración (microsegundos) sin apenas aumentar la temperatura del producto tratado, y por lo tanto, sin alterar sustancialmente sus propiedades sensoriales y nutricionales (Wouters et al., 2001). Estos campos eléctricos producen un fenómeno denominado electroporación, consistente en la formación de poros en las membranas celulares. La formación de poros en la membrana de las células vegetales facilita la extracción de distintos componentes intracelulares de interés para la industria alimentaria (Vorobiev y Lebovka, 2006). Esta tecnología presenta un gran potencial en el proceso de elaboración de vino tinto.

Las estructuras diana de los PEAV son las envolturas celulares. Las bicapas lipídicas suponen una barrera para iones y moléculas polares. Sin embargo en las membranas celulares existen unos poros acuosos que se forman de forma espontánea y permiten el paso de estos compuestos (Figura 2).

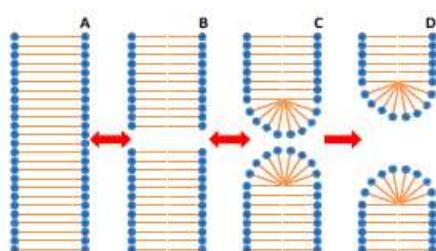


Figura 2. Esquema de la membrana plasmática formada por fosfolípidos, sin ningún poro (A), con un poro hidrofóbico (B), con un poro hidrofílico reversible (C) y con un poro hidrofílico irreversible (D) (Kotnik et al., 2012).

La difusión a través de estos canales supone un proceso energéticamente favorable ya que los lípidos del interior de la membrana no pueden interactuar con estos compuestos e implicaría mucha energía. De manera que, la aplicación de un campo eléctrico externo

induce un potencial a través de la membrana que reduciría la energía necesaria para la formación espontánea de poros hidrofílicos, provocando la aparición de un mayor número de poros que son más estables que en ausencia de un campo eléctrico (Figura 3.3.1).

3.3.2. Parámetros del proceso

Los parámetros más importantes que caracterizan el tratamiento por PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la forma y anchura de pulso, el tiempo de tratamiento, la energía específica, la frecuencia y la resistencia de la cámara de tratamiento.

3.3.2.1. Intensidad de campo eléctrico

La intensidad del campo eléctrico (E) se define como la fuerza por unidad de carga que experimenta la matriz colocada entre los electrodos. Esta intensidad depende del voltaje aplicado y de la configuración de los electrodos. Este parámetro varía aproximadamente desde 0,1 kV/cm hasta los 100 kV /cm (Álvarez et al., 2006).

En cámaras de electrodos paralelos, el campo eléctrico se puede definir como la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos donde se coloca la matriz dividida por la distancia existente entre ellos (d), y se puede considerar uniforme:

$$E = V/d \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Sin embargo, en cámaras colineales o coaxiales, la distribución del campo eléctrico no es homogénea, dependiendo el valor de la intensidad del campo eléctrico en un punto de la cámara del voltaje aplicado entre los electrodos y de su posición (Álvarez et al., 2006).

3.3.2.2. Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico. Se calcula multiplicando el número de pulsos aplicados por la anchura o duración del pulso. La anchura del pulso varía desde 1 nanosegundo a 1 segundo y en función de esta, se han dividido los tratamientos de PEAV en tratamientos de nanosegundos, microsegundos y milisegundos (Puértolas, 2010).

3.3.2.3. Energía por pulso

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento, se genera una corriente eléctrica que circula a través del producto. Para mantener esta diferencia de potencial hace falta aplicar una energía eléctrica. La forma más común de calcular la energía de cada pulso (W) aplicada en el producto durante un tratamiento de pulsos se puede calcular mediante las siguientes ecuaciones:

$$W = V \cdot I \cdot \tau \cdot 1/2 \text{ Para pulsos de caída exponencial} \quad \text{Ec. 1.2}$$

$$W = V \cdot I \cdot \tau \quad \text{Para pulsos de onda cuadrada} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento (V); τ es la anchura del pulso (s); I es la intensidad de la corriente (A).

La energía eléctrica total aplicada durante un tratamiento de PEAV es igual a la energía por pulso (W) multiplicada por el número total de pulsos (n). La energía por unidad de masa o energía específica (W'), se calcula a partir de la energía total aplicada y de la masa de producto procesado (m), expresándose generalmente en kJ/kg:

$$W' = W \cdot n / m \quad \text{Ec. 1.4}$$

Esta energía específica depende del voltaje y de la intensidad de la corriente, del número de pulsos y de su anchura, y de la conductividad y la masa del alimento. Toda la información aportada por este parámetro hace que la energía específica junto con la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento sean los parámetros recomendados a indicar para caracterizar los tratamientos de PEAV (Puértolas, 2010).

3.3.2.4. Frecuencia

La frecuencia se corresponde con el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. La frecuencia utilizada por los equipos de generación de PEAV es muy variable, pudiendo oscilar entre 1 y 5000 Hz. En las cámaras estáticas, una vez establecido el tiempo efectivo de tratamiento (número de pulsos por su anchura), la frecuencia de los pulsos determina el tiempo de permanencia del producto en la cámara, es decir, el tiempo de procesado. En los tratamientos aplicados en condiciones de flujo

continuo, la frecuencia seleccionada junto con el caudal del producto determina el tiempo efectivo de tratamiento del producto (Puértolas, 2010).

3.3.2.5. Resistencia de la cámara de tratamiento

La resistencia de la cámara de tratamiento influye sobre la intensidad de corriente que atraviesa el producto y, por lo tanto, la energía necesaria para generar la diferencia de potencial requerida. La resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento depende de sus dimensiones geométricas y de la conductividad del medio de tratamiento. Cuanto mayor es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento, menor es la resistencia de la cámara de tratamiento, y mayor la energía eléctrica que circula a través de ella, para una diferencia de potencial determinada.

3.4. APLICACIÓN DE LOS PEAV EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN

Cimentándose en el citado fenómeno de la electropermeabilización, la tecnología posee diversas potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, siendo las más estudiadas actualmente, la inactivación microbiana y la mejora de los procesos de transferencia de masa (Puértolas, 2010). En este trabajo nos hemos centrado en esta última aplicación.

Aunque ya en los años 60 se sugirió el uso de la tecnología de los PEAV para mejorar los fenómenos de transferencia de masa en la industria alimentaria (Flaumenbaum, 1968), no fue hasta finales de los años 90 cuando se comenzó a investigar en profundidad su aplicación (Knorr y Angersbach, 1998; Bazhal y Vorobiev, 2000; Bouzrara y Vorobiev, 2003; Fincan y col., 2004; Chalermchat et al., 2004; Schilling y col., 2007, 2008; López y col., 2010).

Los tratamientos necesarios para esta aplicación son generalmente poco intensos, utilizándose normalmente campos eléctricos inferiores a 10kV/cm, por lo que apenas generan calentamiento del producto, son poco costosos energéticamente y además, utilizando los equipos de PEAV actuales, hacen posible el tratamiento de grandes flujos de producto. A pesar de ello, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo a escala de laboratorio, utilizando cámaras estáticas que permiten controlar los parámetros del proceso en los estudios de laboratorio (Puértolas y col., 2010).

Entre las aplicaciones de los PEAV en los procesos de transferencia de masa, se incluyen procesos de extracción sólido-líquido como sacarosa de remolacha azucarera o colorantes de diversas matrices, procesos de extracción por presión, deshidratación, deshidratación osmótica o, curado y marinado de carnes y pescados. Por ejemplo, López y col. (2009), observaron que un tratamiento de 2-10 kV/cm (0,4-6,7 kJ/kg), en la uva como etapa previa a la fermentación-maceración aumentaba de un 14 a un 45% la concentración de polifenoles totales, Donsi y col. (2010) obtuvieron resultados similares sobre la extracción de polifenoles en uva. En otro ejemplo, López y col., 2009, observaron que un tratamiento de 7 kV/cm y 5 pulsos, que supone un gasto energético de 0,24 kJ/kg, aumentaba en más de cuatro veces la cantidad extraída de betalaina de remolacha roja, con respecto al control.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAS PRIMAS, REACTIVOS, INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

4.1.1 Materia Prima

La remolacha roja (*Beta vulgaris L.*) se adquirió en una frutería local. Se eliminaron las hojas y el tallo, y se trabajó solamente con la raíz carnosa. El peso medio de las remolachas fue de 138 g., así como su diámetro de Ø 50-70 mm, evitando la variabilidad de la materia prima lo máximo posible (Figura 3).



Figura 3. Remolacha roja (*Beta vulgaris L.*)

4.1.2 Reactivos

Tampón McIlvaine citrato-fosfato pH3,5. Se prepararon con fosfato disódico anhidro (PANREAC) y ácido cítrico anhidro (PANREAC)

Tampón McIlvaine citrato-fosfato pH3,5. Se prepararon con fosfato disódico anhidro (PANREAC) y ácido cítrico anhidro (PANREAC) ajustado a conductividad 1,5 mS/cm

Tampón McIlvaine citrato-fosfato pH3,5. Se prepararon con fosfato disódico anhidro (PANREAC) y ácido cítrico anhidro (PANREAC) ajustado a conductividad 1 mS/cm

Tampón McIlvaine citrato-fosfato pH3,5. Se prepararon con fosfato disódico anhidro (PANREAC) y ácido cítrico anhidro (PANREAC) ajustado a conductividad 0,5 mS/cm

4.1.3 Instrumental y equipos

- Conductivímetro (mod 524, Crisol Instruments, S.A. Barcelona, España).
- pH-metro (mod. micropH 2001, Crison Instruments, S.A. Barcelona, España).
- Baño termostático (Modelo Selecta PRECISTERM, Barcelona, España).
- Balanza analítica (Modelo Kern, Balingen, Alemania)
- Centrífuga (MiniSpin Plus, Eppendorf Ibérica)
- Sondas de temperatura (Sonda Termopar K de inmersión Crisol Instruments S.A., Alella, Barcelona, España).
- Micropipetas de 100 a 1000 μ L Labware
- Ultraturrax (Ika-Labortechnik, Staufen Br. Alemania).
- Texturómetro (Stable Mycro Systems)
- Sacabocados
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría con un volumen de llenado de 1,5 mL y 10 mm de paso de luz (Cuvettes, Wertheim, Alemania)
- Espectrofotómetro (BIOCHROM Libra S12, Cambridge, Inglaterra)
- Erlenmeyer de 5L

4.2 EXTRACCIÓN DE LA BETANINA DE LA REMOLACHA ROJA

Las remolachas rojas fueron almacenadas en refrigeración (4°C) hasta su uso. Tras seleccionar las remolachas en base a su peso y a su diámetro, se introdujeron en la cámara de tratamiento con el líquido de cobertura adecuado. Para este estudio, se diluyó el tampón McIlvaine pH 3,5 con agua destilada hasta ajustarlo a una conductividad eléctrica de 1,5 mS/cm, manteniéndolo a temperatura ambiente que fue de unos 25°C. Las remolachas fueron tratadas con diferentes condiciones de PEAV, y tras ser pulsadas, se pelaron, trocearon y se trituraron hasta un tamaño de partícula de 5 mm aproximadamente, de manera que toda la remolacha estuviese triturada de manera homogénea. Para poder realizar el proceso de extracción de la betanina de la remolacha, se pesaron 50g de cada remolacha tratada y, posteriormente, se vertieron en Erlenmeyer de 5L, conteniendo cada Erlenmeyer 1L de tampón McIlvaine ajustado a pH 3,5.

Una vez vertidos los trozos de remolacha en los Erlenmeyer, el proceso de extracción se llevó a cabo durante 180 minutos, a 25°C y sin agitación continua. Durante este tiempo se fueron tomando muestras a diferentes tiempos (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 160 y 180 minutos). Tras los 180 min de extracción, la extracción se interrumpió extrayendo los trozos de remolacha de los Erlenmeyer. Finalmente, de cada remolacha diferente se pesaron 15g., se trituraron con ayuda de un Ultraturrax, y se vertieron en diferentes Erlenmeyer con 300mL de tampón McIlvaine pH 3,5.

4.2.1 Influencia de la conductividad del medio de tratamiento y de la temperatura en el efecto de los PEAV.

En el efecto de los PEAV, también se estudiaron la conductividad y la temperatura, manteniendo las mismas condiciones en el proceso de extracción que aquellas indicadas en el apartado 4.2.

Para el estudio de la conductividad, el líquido de cobertura de la cámara de tratamiento, tampón McIlvaine pH 3,5, se ajustó con agua destilada a diferentes conductividades, 0,5kv/cm y 1kv/cm. Mientras que, para el estudio de la temperatura, el líquido de cobertura, así como la cámara de tratamiento y las remolachas, fueron mantenidas a las temperaturas de estudio, 5°C y 18°C, refrigerándose desde la noche anterior. Como la temperatura no influía en el ajuste de la conductividad del tampón, el ajuste de las conductividades se realizó a temperatura ambiente.

4.2.2 Cuantificación de betanina.

La concentración de betanina en el medio de extracción fue determinada por el método descrito por Nilsson (1970). Para ello, una muestra de 1 ml de líquido de extracción se centrifugó a 14000g durante 90 segundos. Del sobrenadante obtenido, se realizó la lectura de absorbancia a dos longitudes de onda (537 y 600 nm) en una cubeta de 1 cm de paso de luz. Posteriormente, con los valores de absorbancia obtenidos a las dos longitudes de onda, se calculó la absorbancia de la betanina mediante la siguiente ecuación:

$$A_{\text{betanina}} = 1,095 \cdot (A_{537} - A_{600}) \quad \text{ec.1.5}$$

donde A es la absorbancia de la betanina; A_{537} es la absorbancia de las betacianinas a 537 nm y A_{600} es la absorbancia de las betaxantinas a 600nm.

Para el cálculo de la concentración de betanina (C_t) extraída de la remolacha roja, expresada en mg betanina/g remolacha, se recurrió a la ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción molar de la betanina en agua ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1120$) (Henry, 1996).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad \text{ec.1.6}$$

donde A es la absorbancia; ϵ , el coeficiente de extinción molar ($\text{cm}^{-1} \cdot M^{-1}$); l el paso de luz (cm); y C la concentración molar del soluto (M).

Finalmente, para calcular el rendimiento de la extracción (%), se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y_t (\%) = \frac{C_t}{MCBE} \cdot 100 \quad \text{ec.1.7}$$

donde C_t es la concentración de betanina obtenida en el proceso de extracción tras un tiempo t; y MCBE, la máxima concentración de betanina extraíble.

La MCBE se obtuvo sumando la concentración final de extracción de betanina a los 180min, con la obtenida con el nuevo medio de extracción.

4.3 EQUIPO DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Los tratamientos se aplicaron mediante un equipo de pulsos eléctricos comercial, modelo EPULSUS®-PM1-10 (Energy Pulse System, Lisbon, Portugal). Se trata de un generador Marx de pulsos eléctricos de onda cuadrada de 10 kV de voltaje máximo, 180 A de corriente máxima permitida y 3,5 kW de potencia. Es un equipo compacto, de 800×600×400 mm de dimensiones y 80 kg de peso. El equipo se maneja mediante una pantalla táctil en la que se pueden modificar el voltaje aplicado (hasta 10 kV), la anchura del pulso (de 5 a 100 μ s) y la frecuencia de aplicación (hasta 200 Hz).



Figura 4. Equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) de onda cuadrada. (1) Generador de pulsos (2) Zona de tratamiento (3) Osciloscopio

El generador de pulsos se basa en la descarga de unos condensadores desde un generador de tipo Marx, cuyo circuito simplificado se muestra en la figura 4A.

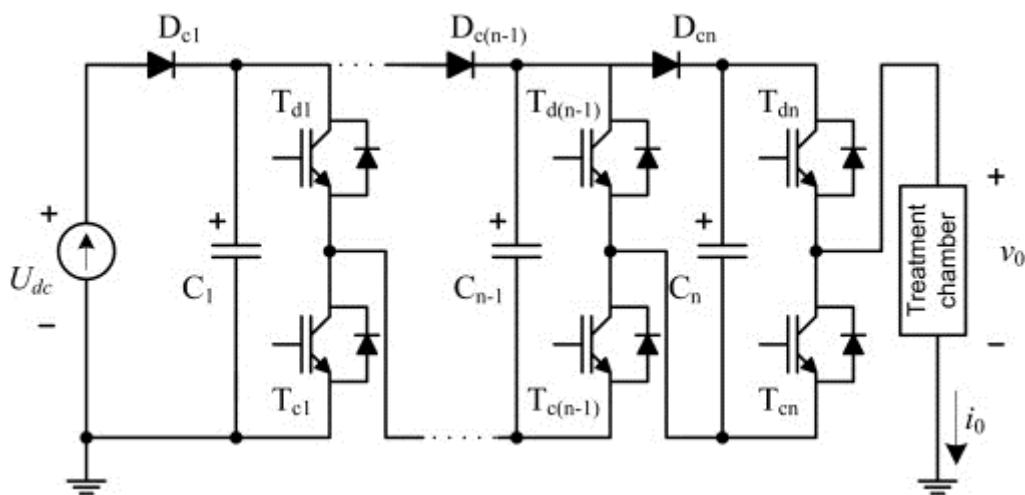


Fig. 4A. Circuito simplificado del generador de pulsos eléctricos basado en la tecnología Marx usado en este trabajo.

El generador se conectó a una cámara de tratamiento de electrodos paralelos de 80 mm de diámetro y 66 mm de separación entre electrodos, como se muestra en la figura 4B. Cada remolacha se introdujo individualmente en la cámara de tratamiento, y la zona de tratamiento se rellenó con tampón McIlvaine de pH 3,5 a la conductividad adecuada, como líquido conductor, sin dejar burbujas para evitar la formación de arcos eléctricos. La configuración de electrodos paralelos hace que la distribución del campo eléctrico sea homogénea, por lo que es la configuración idónea para el estudio de la influencia de los parámetros del proceso.



Figura 4B. Cámara de tratamiento con la remolacha roja en la zona de tratamiento del equipo de PEAV.

4.3.1 Parámetros utilizados en el tratamiento por PEAV

El tratamiento por PEAV se realizó a tres diferentes campos eléctricos, entre ellos, 0,5 kV/cm, 1kV/cm y 1,5kV/cm. La **intensidad del campo eléctrico (E)**, expresada en kV/cm, se puede definir como la diferencia de potencial potencial (V) existente entre dos electrodos dividida por la distancia que los separa (d).

$$E = \frac{V}{d} \quad \text{ec. 1.8}$$

El tiempo total de tratamiento aplicado fue diferente, variando según el campo eléctrico aplicado. De manera que, para un campo eléctrico de 1,5 kV/cm se aplicaron 100 μ s totales de tratamiento, para uno de 0,5 kV/cm 1000 μ s, mientras que para un campo eléctrico de 1kV/cm se consideraron ambos tiempos totales de tratamiento, es decir, 100 y 1000 μ s. **El tiempo total de tratamiento (t)** queda determinado por el número de pulsos y por la anchura del pulso, de manera que para calcular el tiempo total de tratamiento el número de pulsos (n) se multiplica por la anchura de pulso (τ).

$$t = n \cdot \tau \quad \text{ec. 1.9}$$

Esto permite aplicar mismos tiempos totales de tratamiento, pero con diferentes condiciones. Para ello, la aplicación de un tiempo total de tratamiento de 100 μ s se realizó mediante las combinaciones de 20 pulsos de 5 μ s, 4 pulsos de 25 μ s y 2 pulsos de 50 μ s; mientras que, para aplicar 1000 μ s de tiempo total de tratamiento, se mantuvo la anchura de pulso cambiando únicamente el número de pulsos, esto es, 200 pulsos de 5 μ s, 40 pulsos de 25 μ s y 20 pulsos de 50 μ s. La anchura de pulso quedaría definida como el tiempo comprendido entre que se alcanza el voltaje máximo hasta que disminuye a 0, correspondiéndose con la duración del pulso.

La energía del pulso (W) es la energía aplicada sobre el alimento cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento. Esta energía aplicada se calculó a partir del voltaje, la intensidad de la corriente que circula y la anchura de pulso.

$$W = V * I * \tau$$

ec.1.10

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento (Voltios); τ es la anchura del pulso (s); I es la intensidad de la corriente eléctrica (Amperios).

Dividiendo la energía del pulso por el peso de la muestra tratada, se determinó la energía específica por pulso (kJ/kg). Así, multiplicando la energía específica por pulso por el número de pulsos, se calculó la energía específica total aplicada (kJ/kg) que permite realizar una estimación del coste del proceso. Esta energía total, depende del tiempo total de tratamiento, y es diferente para cada campo eléctrico, obteniendo las energías específicas indicadas en la tabla 2.

4.3.2 Influencia de la conductividad del medio de tratamiento y de la temperatura en el efecto de los PEAV

Para el estudio tanto de la conductividad como de la temperatura en el efecto de los PEAV, los parámetros utilizados fueron iguales en los dos casos. Así, se aplicaron dos campos eléctricos diferentes, 1,5 kV/cm y 1kV/cm con 100 μ s de tiempo total de tratamiento, en forma de 2 pulsos de 50 μ s de anchura.

Tabla 2. Energía específica total aplicada (kJ/kg) para cada tratamiento por PEAV a diferentes intensidades de campo eléctrico (kV/cm) y tiempos totales de tratamiento (μ s).

Parámetro PEAV		Energía específica total aplicada (kJ/kg)
E(kV/cm)	t (μ s)	
0,5	1000	0,31
1	1000	1,24
1	100	0,124
1,5	100	0,34

4.4. ANÁLISIS DE TEXTURA DE LA REMOLACHA ROJA

Para la medida de la textura se empleó un texturómetro con una sonda de corte. La textura de la remolacha se analizó en diferentes remolachas tratadas por los parámetros PEAV indicados en el apartado 4.3.1., así como también se analizó en muestras no tratadas.

De cada remolacha se tomaron tres muestras paralelas a su eje con la ayuda de un sacabocados, tal como se indica en la figura 5, y posteriormente cada cilindro obtenido, se analizó con el texturómetro. El análisis de textura se realizó en tres partes diferentes del cilindro de la remolacha, ya que la dirección de las fibras de la remolacha podía influir en las medidas de textura, produciendo variabilidad en los resultados para una misma remolacha.

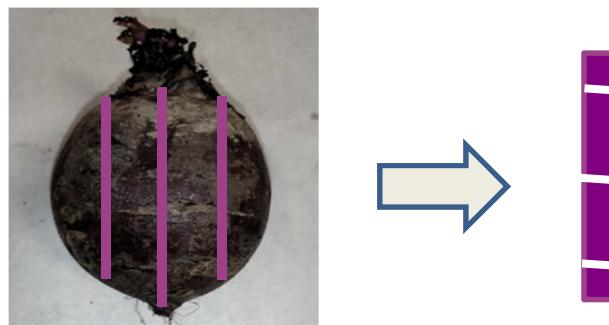


Figura 5. Toma de muestras de la remolacha para realizar los estudios de la fuerza de corte.

4.5 MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

En el estudio de la influencia del tiempo de extracción en la concentración de betanina de las muestras tratadas por PEAV y control, se realizaron diferentes curvas de extracción, en las que se relaciona el rendimiento de extracción de betanina de la remolacha roja en el líquido de extracción a lo largo del tiempo. Por lo que para la realización de estas gráficas se utilizó el modelo matemático propuesto por So and MacDonald (1986) basada en dos cinéticas de primer-orden con diferentes constantes, expresada según la siguiente ecuación (Brüniche-Olsen, 1962):

$$c^* = c_w^* [1 - \exp(-k_w t)] + c_d^* [1 - \exp(-k_d t)] \quad \text{ec.1.11}$$

donde $c^* = c/c_\infty$, c es la concentración de soluto de la disolución a cualquier tiempo durante el proceso de extracción, c_∞ es el equilibrio en la concentración de soluto, $c_w^* = c_w/c_\infty$, c_w es el final de la concentración de soluto en la solución debido solo a la etapa de lavado, mientras que, $c_d^* = c_d/c_\infty$, c_d es la concentración final de soluto en la solución debido solo a la etapa de difusión, $k_w (\text{min}^{-1})$ es la constante para la etapa de lavado y $k_d (\text{min}^{-1})$ es la constante para la etapa de difusión.

También se utilizó la ecuación de Fick, un modelo matemático basado en una cinética de primer orden con una constante, expresado en la ecuación 9. Esta ecuación ha sido utilizada por diversos autores para describir los procesos de extracción sólido-líquido de diferentes componentes intracelulares (Spigno y col., 2006; Vorobiev y Lebovska, 2006).

$$Y_t = Y_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad \text{ec.1.12}$$

donde Y_t es la concentración de betaninas extraídas tras un tiempo t de extracción (expresado en minutos); Y_{\max} es la concentración máxima de betaninas una vez alcanzado el equilibrio; k es la constante que determina la velocidad del proceso de extracción (min^{-1}).

El ajuste del modelo a los valores de las curvas de extracción obtenidas experimentalmente se realizó con el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Además de los análisis estadísticos indicados para la realización del diseño experimental como para el ajuste del modelo de extracción ya presentado, los cálculos del error estándar de la media y los análisis de varianza ($p=0,05$), se llevaron a cabo con el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los PEAV en la mejora de la extracción de betanina de remolacha roja ha sido investigado por distintos autores (López et al., 2009, Loginova et al., 2011, Luengo et al., 2016). En estos estudios, el tratamiento se ha aplicado a cilindros de remolacha de distintas dimensiones. En esta investigación, se ha estudiado la mejora de la extracción de betanina de remolacha roja mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV a la remolacha entera con objeto de simular un procesado industrial. En la actualidad, existen equipos de PEAV a escala industrial capaces de procesar 50 tn/h de patatas enteras que podría utilizarse para el tratamiento de piezas enteras de remolacha roja para mejorar la extracción de betanina. Por otro lado, en este estudio se ha investigado por primera vez el efecto de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y de la anchura de pulso en la electroporación de piezas enteras de remolacha roja sumergidas en un medio líquido.

5.1 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DEL CAMPO ELÉCTRICO

La influencia de la intensidad del campo eléctrico en la mejora de la extracción de betanina de remolacha roja se ilustra, como un ejemplo, en la figuras 6A y 6B. Estas figuras muestran la extracción a lo largo del tiempo de betanina de remolacha roja tratada con un tratamiento de PEAV con 40 pulsos de 25 μ s de anchura y una intensidad de campo eléctrico de 0,5 y 1 kV/cm (Fig. 6A) y con 4 pulsos de 25 μ s de anchura y una intensidad de campo eléctrico de 1 y 1,5 kV/cm (Fig. 6B). Debido a que al disminuir la intensidad del campo eléctrico se requiere prolongar el tiempo total de tratamiento para conseguir electroporar las células, en el rango de intensidades de campo eléctrico más bajas (0,5 y 1 kV/cm) se comparan las curvas de extracción tras un tiempo total de tratamiento de 1000 μ s mientras que en el rango de intensidades de campo eléctrico mayores (1 y 1,5 kV/cm) se comparan las curvas de extracción tras un tiempo de tratamiento 10 veces menor (100 μ s). En ambas figuras se incluye la gráfica de extracción correspondiente a la muestra sin tratar por PEAV (control).

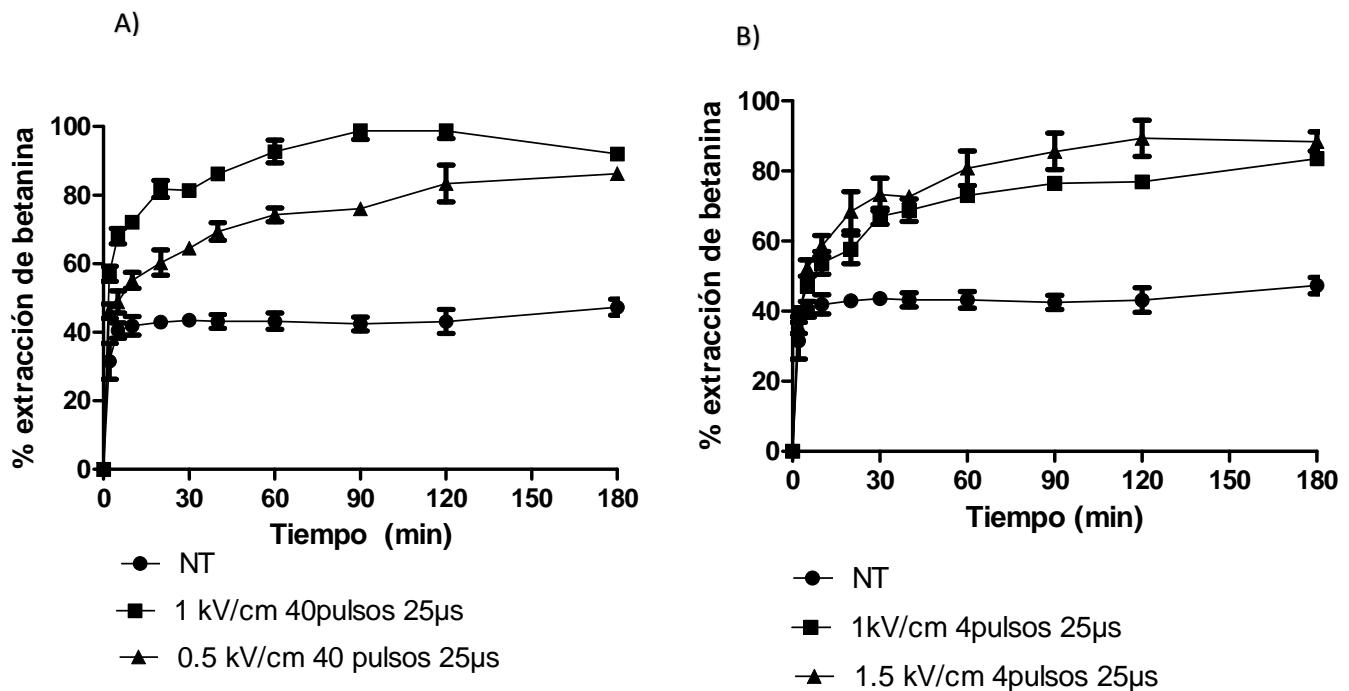


Figura 6. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la extracción de betanina de remolacha roja a 1000 μ s (A) y 100 μ s (B).

La figura 6A muestra las curvas de extracción tras aplicar 40 pulsos de 25 μ s de anchura (tiempo total 1000 μ s) a una intensidad de 0,5 y 1 kV/cm. Se observa que en ambos casos la extracción fue más rápida en las muestras tratadas por PEAV que en la muestra control y que tanto la velocidad de extracción como la cantidad de betanina extraída fue mayor cuanto mayor era la intensidad del campo eléctrico. Por ejemplo, tras 90 minutos de extracción se extrajo el 40% del contenido total de betanina contenido en la remolacha en la muestra control y el 68 y el 90 % en las muestras previamente tratadas a 0,5 y 1 kV/cm, respectivamente.

La figura 6B muestra las curvas de extracción tras aplicar 4 pulsos de 25 μ s de anchura (tiempo total 100 μ s) a una intensidad de campo de 1 y 1,5 kV/cm. En este caso, se observa que el incremento del campo eléctrico de 1 a 1,5 kV/cm apenas incrementó la cantidad de betanina extraída de la remolacha roja. Estos resultados indican la existencia de un campo eléctrico máximo por encima del cual el incremento del campo eléctrico no aumenta significativamente la electroporación de las células de la remolacha roja. La existencia de este campo eléctrico máximo ha sido descrito por otros autores durante la electroporación de distintos tipos de células (Puértolas et al., 2010;

Luengo et al., 2014). El incremento del efecto de los pulsos eléctricos al aumentar la intensidad de campo eléctrico podría estar relacionado con un incremento del número de células electroporadas. La aplicación de un campo eléctrico externo provoca un incremento del potencial transmembrana de las células. Para que se manifieste la electroporación este potencial transmembrana debe superar un determinado umbral y el potencial transmembrana generado por el campo eléctrico externo depende entre otros factores del tamaño de las células. El incremento del campo eléctrico aplicado podría provocar que se alcanzara el potencial transmembrana en aquellas células de la remolacha roja de un menor tamaño donde no se alcanzaba el potencial transmembrana umbral al aplicar campos eléctricos de menor intensidad. Una vez aplicado el campo eléctrico capaz de generar el potencial transmembrana capaz de electroporar todas las células, nuevos incrementos del campo eléctrico no provocarían un aumento del número de células electroporadas y por tanto, del efecto de los tratamientos por PEAV.

5.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO

La figura 7 muestra, como un ejemplo, la influencia del tiempo de tratamiento (número de pulsos x anchura de pulso) en la extracción de betanina de remolacha tratada a la misma intensidad de campo eléctrico (1 kV/cm). Se observa que el tratamiento más largo 1000 μ s (20 pulsos de 50 μ s) fue más eficaz que el tratamiento de 100 μ s (20 pulsos de 5 μ s). Por ejemplo, tras 90 minutos de extracción la cantidad de betanina extraída fue de 2 y 1,5 veces mayor respecto al control cuando la remolacha se trató previamente durante 1000 y 100 μ s respectivamente.

El Belghiti y Vorebiev (2004), también observaron que el incremento del tiempo de tratamiento por PEAV aumentó la extracción de azúcar de remolacha. En general, al igual que ocurre con la intensidad del campo eléctrico, el aumento del tiempo de tratamiento hasta un determinado valor aumenta el efecto de los tratamientos por PEAV. El incremento observado en la extracción de betanina del interior de las células de la remolacha al aumentar el tiempo de tratamiento podría estar relacionado con un aumento del tamaño de los poros formados a medida que se prolonga el tratamiento lo que favorecería la salida de betanina al medio extracelular.

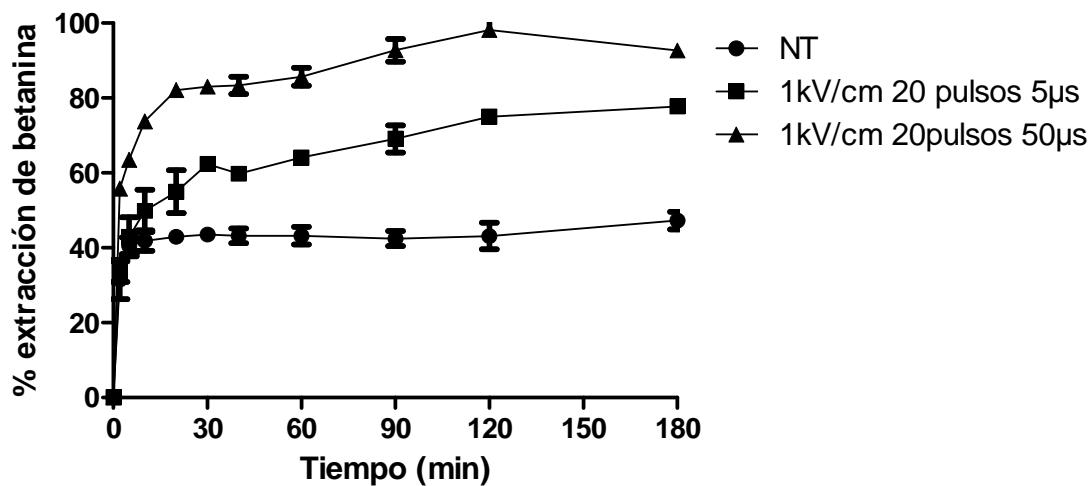


Figura 7. Influencia del tiempo total de tratamiento en la extracción de betanina de la remolacha roja a un campo eléctrico de 1 kV/cm.

5.3 INFLUENCIA DE LA ANCHURA DE PULSO

El presente estudio se realizó con un equipo que permite aplicar pulsos de onda cuadrada de diferente anchura, por lo que también se investigó si la anchura del pulso influía en la electroporación de las células de la remolacha roja tratada por PEAV. La figura 8 compara las gráficas de extracción obtenidas tras tratar la remolacha a tratamientos de PEAV de una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm, una duración de 1000 μ s y distinta anchura de pulso (5, 25 y 40 μ s). Al aumentar la anchura de pulso fue necesario aplicar menos número de pulsos para conseguir un tiempo de tratamiento total de 1000 μ s. Mientras que con una anchura de 5 μ s fue necesario aplicar 200 pulsos, cuando se aumentó la anchura de cada pulso a 50 μ s tan solo fueron necesarios 40 pulsos para alcanzar el tiempo de tratamiento establecido. Como se muestra en la gráfica, en el rango de condiciones investigadas el efecto del tratamiento en la mejora de la extracción de betanina fue independiente de la anchura del pulso. Las curvas de extracción tras aplicar el mismo tiempo total de tratamiento utilizando distintas anchuras de pulso fueron similares, indicando que el efecto del tratamiento era debido al tiempo total al que las células estaban sometidas a la acción del campo eléctrico, en lugar de a la anchura o número de pulsos aplicados.

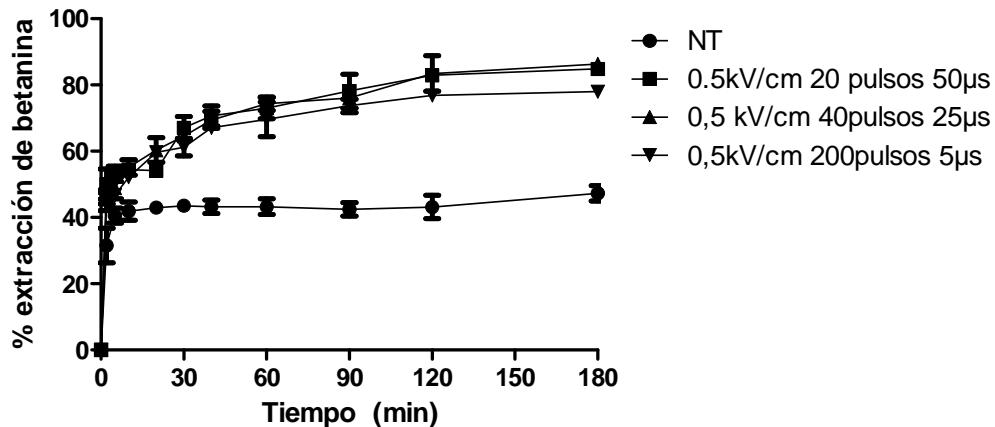


Figura 8. Influencia de la anchura de pulso en la extracción de la betanina de la remolacha roja tras un tiempo total de tratamiento de 1000 μ s.

5.4 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE BETANINA DE REMOLACHA ROJA TRATADA POR PEAV

Generalmente, el fenómeno de extracción sólido-líquido a través de membranas celulares se suele describir mediante un modelo que asume que la extracción de betanina es función exponencial del tiempo de extracción (ecuación 1.12). Este modelo, permite estimar la cantidad de betanina extraída en el equilibrio ($t=\infty$) y una constante de velocidad que depende de las condiciones de extracción. La figura 9 muestra el ajuste de este modelo exponencial a las gráficas de extracción de betanina de una remolacha roja sin tratar (control) y de muestras de remolacha roja tratadas por PEAV de distinta intensidad. Se observa que, mientras que el modelo exponencial describió adecuadamente la extracción de betanina de la muestra control, en el caso de las muestras tratadas por PEAV el modelo no se ajustó adecuadamente a los datos experimentales.

Esta discrepancia probablemente es debida a que tras el tratamiento de PEAV parte del contenido intracelular es forzado a salir al exterior de la célula debido al incremento de la permeabilidad de la membrana celular por el tratamiento de PEAV y a la presión existente en el interior de la célula responsable de su turgencia (Figura 10). Como consecuencia, la superficie del tejido se cubre de líquido que sale rápidamente del interior de las células, y así cuando las partículas de remolacha se sumergen en el líquido de extracción, el líquido extracelular se lava rápidamente pasando al medio de

extracción. Una vez producido este fenómeno, el resto del contenido intracelular va pasando más lentamente al medio de extracción por difusión.

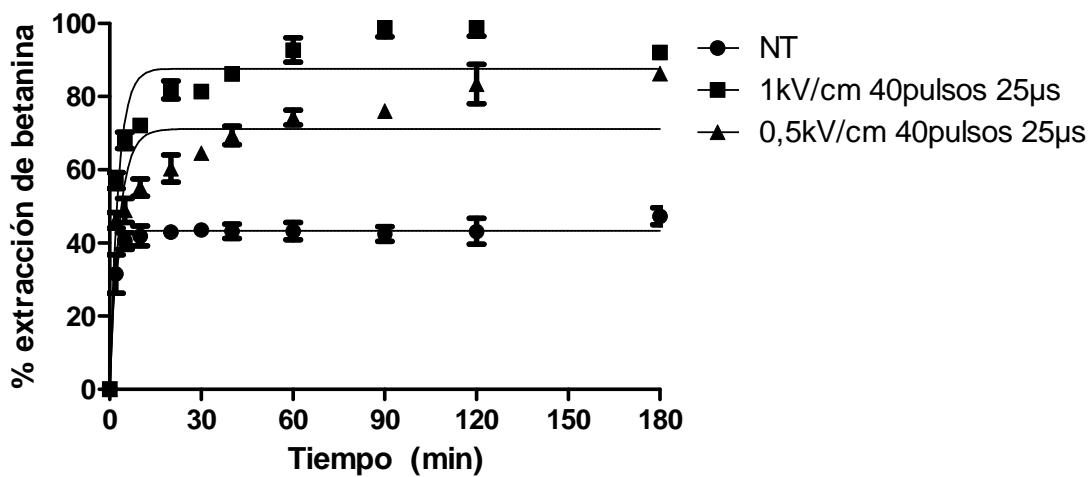


Figura 9. Ajuste de modelo exponencial con la ecuación de Fick.

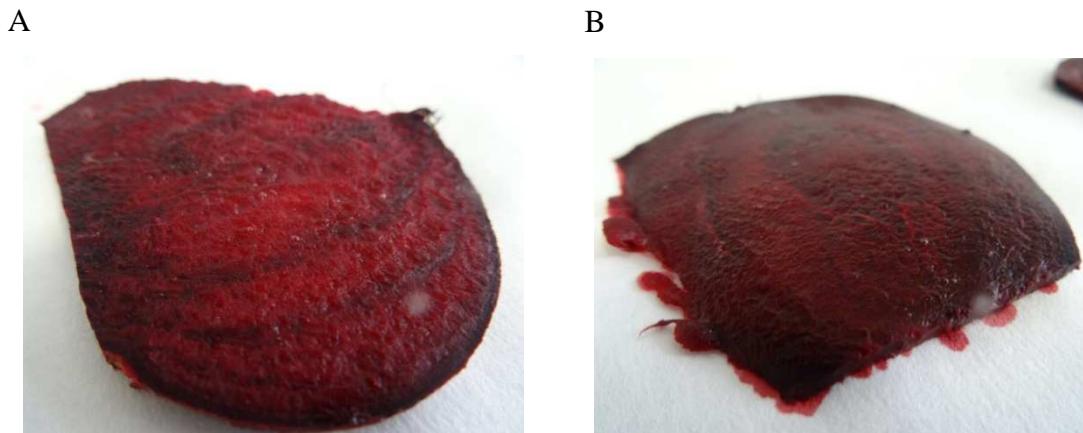


Figura 10. Aspecto de un corte de remolacha roja sin tratar (A) y tratada por PEAV (B).

Por lo tanto, para describir las curvas de extracción de un producto tratado por PEAV se requiere utilizar un modelo que describan simultáneamente el fenómeno de lavado y el fenómeno de difusión. Como se observa en la figura 11, el uso de un modelo basado en dos cinéticas de primer orden con constantes de velocidad diferentes (ecuación 1.11) permitió describir adecuadamente las gráficas de extracción de betanina a partir de la remolacha roja tratada por PEAV.

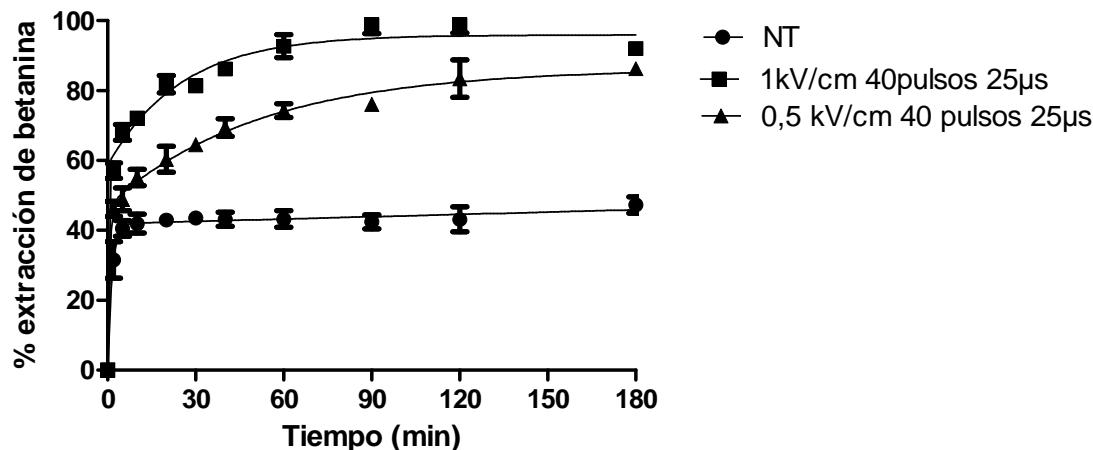


Figura 11. Ajuste basado en un modelo matemático que asume la existencia de una fase de lavado y una fase de difusión durante la extracción de betanina de remolacha tratada por PEAV.

La tabla 3 muestra los parámetros que se obtuvieron al ajustar todas las curvas de extracción de betanina de remolacha roja tratada por PEAV de distinta intensidad, tiempo de tratamiento y anchura de pulso. Como se ha descrito en la sección de *Material y Métodos*, K_w y K_d representan las constantes de velocidad correspondientes al fenómeno de lavado y al fenómeno de difusión respectivamente, mientras que C_w y C_d se corresponden con el porcentaje de betanina extraída por lavado en el equilibrio ($t=\infty$) y por difusión en el equilibrio ($t=\infty$), respectivamente. Los coeficientes de determinación de los ajustes (R^2) que también se muestran en la tabla fueron en todos los casos iguales o superiores a 0,95 indicando que dicho modelo podía utilizarse satisfactoriamente para describir la extracción de betanina a partir de la remolacha roja tratada por PEAV.

El análisis de los parámetros del modelo que aparecen en la tabla 1 indican que las velocidades de extracción K_w y K_d no estaban influenciadas por la intensidad del campo eléctrico aplicado, el tiempo de tratamiento y la anchura del pulso. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las variables K_w y K_d en las condiciones experimentales ensayadas. Se observó que el valor medio de la K_w ($1,23 \text{ min}^{-1}$) era casi 50 veces más elevado que el valor medio de la K_d ($0,025 \text{ min}^{-1}$) lo que indica como era de esperar que el fenómeno de lavado es mucho más rápido que el fenómeno de difusión.

Tabla 3. Parámetros obtenidos tras los ajustes de las curvas de extracción de betanina de remolacha roja tratada por PEAV de distinta intensidad (kV/cm), número de pulsos y anchura de pulso (μ s), con los correspondientes intervalos de confianza para el 95%.

	C_w	K_w	C_d	K_d	R^2
0,5-200-5	43,47 \pm 4,45	2,214 \pm 5,12	34,21 \pm 0,34	0,02690 \pm 0,02	0,9826
0,5-40-25	47,10 \pm 4,59	1,474 \pm 1,22	39,25 \pm 0,63	0,01931 \pm 0,02	0,9757
0,5-20-50	49,31 \pm 5,52	2,168 \pm 5,628	36,05 \pm 6,34	0,02009 \pm 0,01	0,9817
1-200-5	59,98 \pm 4,79	0,7626 \pm 0,20	33,67 \pm 8,67	0,02427 \pm 0,49	0,9868
1-40-25	63,02 \pm 6,05	1,028 \pm 0,43	33,44 \pm 5,86	0,03353 \pm 0,01	0,9844
1-20-50	63,45 \pm 6,69	0,9230 \pm 0,36	31,37 \pm 6,45	0,02935 \pm 0,02	0,9869
1-20-5	45,19 \pm 6,94	0,6016 \pm 0,29	35,18 \pm 9,18	0,01419 \pm 0,01	0,9715
1-4-25	43,99 \pm 5	0,9474 \pm 0,42	36,780 \pm 4,86	0,02736 \pm 0,009	0,9814
1-2-50	41,37 \pm 3,15	1,019 \pm 0,39	39,71 \pm 4,57	0,01469 \pm 0,001	0,9775
1,5-20-5	42,91 \pm 6,18	0,7983 \pm 0,38	43,86 \pm 5,88	0,02551 \pm 0,008	0,9797
1,5-4-25	51,17 \pm 11,27	0,5434 \pm 0,30	38,31 \pm 10,2	0,02585 \pm 0,02	0,9550
1,5-2-50	43,89 \pm 12,66	2,276 \pm 14,31	46,35 \pm 12,16	0,04343 \pm 0,02	0,9626

Debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores K del proceso de lavado y difusión, y con objeto de simplificar el modelo, se volvieron a ajustar las curvas de extracción a la misma ecuación, pero sustituyendo las variables K_w y K_d por los valores medios calculados a partir de los valores obtenidos en el primer ajuste.

La tabla 4 muestra los valores de C_w y C_d obtenidos tras el segundo ajuste del modelo. Los coeficientes de determinación obtenidos ($\geq 0,95$) en este segundo ajuste indicaron que el modelo simplificado seguía siendo adecuado para describir las curvas de extracción. En todos los casos, se observó que la cantidad de betanina extraída por lavado (C_w) era mayor que la extraída por difusión. Por ejemplo, tras un tratamiento de 1 kV/cm con 40 pulsos de 20 μ s en la fase de lavado se extrajo más del 60% del contenido total de betanina de la remolacha, mientras que en la de difusión se extrajo alrededor del 35 %. Por otro lado, ni en la cantidad de betanina extraída en la fase de lavado ni en la extraída en la fase de difusión se observaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar tratamientos de distinta anchura de pulso. Es decir, el efecto observado en la mejorara de la extracción de betanina dependió de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo total de tratamiento. Aunque la anchura de pulso no afectó

a la eficacia de la electroporación el uso de pulsos más anchos presenta una clara ventaja desde el punto de vista de aplicación de la tecnología en un proceso en flujo continuo, ya que permite procesar más cantidad de producto por unidad de tiempo sin modificar la frecuencia de aplicación de los pulsos. Por ejemplo, manteniendo la frecuencia, la aplicación de pulsos de 50 μ s permite duplicar la cantidad de producto que se puede procesar frente a un tratamiento de 25 μ s y aumentar por 10 la cantidad de producto que se puede procesar frente a un tratamiento de 5 μ s.

Debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de la misma duración e intensidad de campo eléctrico aplicado con pulsos de diferente anchura, la cantidad de betanina extraída se calculó a partir de la suma de los valores medios de la betanina extraída por lavado y por difusión.

Tabla 4. Valores de C_w y C_d obtenidos tras el segundo ajuste del modelo.

	C_w	C_d	R^2
0,5-200-5	45,18	32,71	0,9816
0,5-40-25	46,02	37,37	0,9731
0,5-20-50	49,52	33,44	0,9781
1-200-5	56,66	37,65	0,9816
1-40-25	64,58	34,06	0,9811
1-20-50	62,61	37,79	0,9841
1-20-5	38,54	37,06	0,9638
1-4-25	43,52	38,31	0,9799
1-2-50	37,85	37,35	0,9708
1,5-20-5	40,98	46,58	0,9774
1,5-4-25	45,8	45,49	0,9415
1,5-2-50	51,08	43,09	0,9559

La tabla 5 muestra los valores medios obtenidos para las distintas intensidades de campo eléctrico y tiempos de tratamientos aplicados. Además, se muestra la cantidad total de betanina extraída obtenida al sumar la cantidad de betanina extraída por lavado y por difusión.

Por lo que respecta a la cantidad de betanina extraída por difusión no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados a 0,5 kV/cm durante 1000 μ s, 1,5 kV/cm durante 100 μ s y 1 kV/cm durante 100 μ s. Tras aplicar estas condiciones de tratamiento se extrajo alrededor del 40% del contenido total de betanina contenido en la remolacha roja. El tratamiento que permitió extraer la mayor cantidad de betanina en el proceso de lavado fue el aplicado a 1 kV/cm durante 1000 μ s. Dicho tratamiento consiguió extraer alrededor del 60% de la betanina contenida en la remolacha durante la fase del lavado. La extracción durante la fase de lavado es una extracción muy rápida ya que en esa fase la betanina pasa al medio de extracción en menos de 5 minutos. Por lo tanto, la aplicación del tratamiento de 1 kV/cm durante 1000 μ s permitiría extraer simplemente con 5 minutos de extracción un 20% más de betanina que en la muestra control en la que como máximo se extrajo el 40 % del contenido de betanina de la remolacha.

Tabla 5. Valores medios de C_w y C_d , así como las concentraciones totales al final del proceso de extracción (180 min), obtenidos para las distintas intensidades de campo eléctrico y tiempos de tratamientos aplicados.

	C_w	C_d	C_t
No Tratada			43,40
0,5 kV/cm 1000 μs	46,90	34,50	81,41
1kV/cm 1000 μs	61,28	36,5	97,78
1kV/cm 100 μs	39,97	37,57	77,54
1,5kV/cm 100μs	45,95	45,05	91,00

La figura 11 compara la cantidad total de betanina extraída tras la aplicación de los tratamientos de PEAV de distinta intensidad con la cantidad de betanina total extraída de la remolacha sin tratar. Se observa en todos los casos una mejora de la extracción total de betanina tras la aplicación previa de un tratamiento de PEAV.

La cantidad total de betanina extraída incrementó un 40, 57, 36 y 49% aproximadamente respecto a la muestra control tras electroporar la remolacha con 0,5 kV/cm durante 1000 μ s, 1 kV/cm durante 1000 μ s, 1 kV/cm durante 100 μ s y 1,5 kV/cm durante 100 μ s respectivamente. A la vista de los resultados obtenidos, el tratamiento que permitió conseguir una mayor extracción de betanina fue el de 1 kV/cm

durante 1000 μ s. Con este tratamiento prácticamente se extrajo la totalidad de la betanina contenida en la remolacha (97%). Por otra parte, al aumentar el campo eléctrico a 1,5 kV/cm se logró extraer un poco menos de betanina (90%) pero se redujo el tiempo de tratamiento 1000 a 100 μ s.

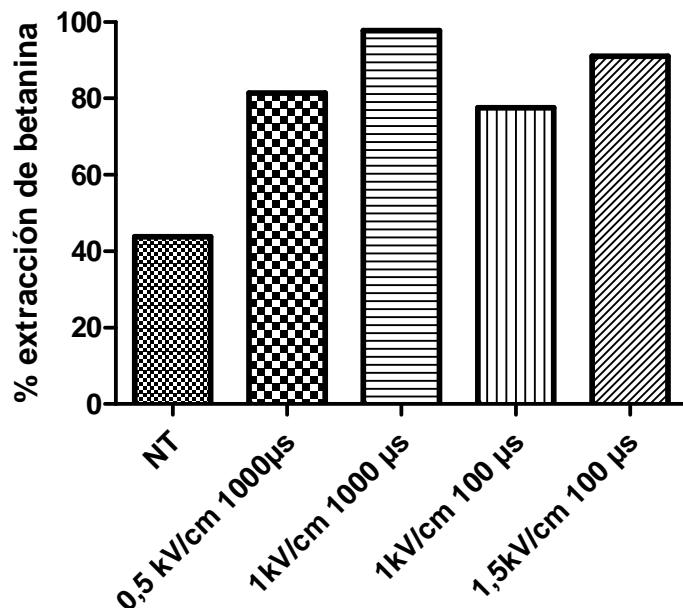


Figura 11. Porcentaje de extracción de betanina estimada por el modelo de la remolacha roja tras la aplicación de PEAV de diferentes intensidades.

A la hora de decidir el tratamiento óptimo en un proceso industrial, además de considerar el rendimiento del proceso de extracción, hay que considerar otros parámetros como el número de pulsos a aplicar y el consumo energético del tratamiento. En este caso, la disminución de 10 veces en el tiempo de tratamiento redujo el consumo energético del tratamiento de 1,24 kJ/kg a 0,34 kJ/kg con solo aumentar 0,5 kV el campo eléctrico. Por lo tanto, aunque el rendimiento del proceso de extracción era un 7% menor, el hecho de que el consumo energético del tratamiento a 1,5 kV/cm durante 100 μ s fuera 3,6 veces inferior haría que probablemente éste fuera el tratamiento que elegiría una compañía para tratar las remolachas mediante PEAV.

5.5 INFLUENCIA DE LA CONDUCTIVIDAD Y TEMPERATURA DEL MEDIO DE TRATAMIENTO EN LA MEJORA DE LA EXTRACCIÓN DE BETANINA POR TRATADA POR PEAV

Una vez establecidas las condiciones de tratamiento por PEAV más adecuadas para mejorar la extracción de betanina roja de la remolacha roja en términos de rendimiento y costes energéticos, se decidió estudiar la influencia de la conductividad del medio de tratamiento y de la temperatura de tratamiento.

Debido a que la remolacha roja se trató entera sumergida en un líquido, es posible, a diferencia de otros casos en los que el producto se trata directamente, modificar la conductividad del medio de tratamiento independientemente de la conductividad que tenga la remolacha. Por ello, se investigó la influencia de la conductividad del medio de tratamiento en el efecto de los pulsos eléctricos sobre la remolacha. La conductividad influye en la resistencia de la cámara de tratamiento que depende además de sus dimensiones. Por otro lado, la resistencia de la cámara de tratamiento influye en la energía específica total que se requiere para generar el campo eléctrico y, por lo tanto, en el coste del tratamiento.

La figura 12, muestra la influencia de la conductividad del medio en el que se trató la remolacha roja en la extracción total de betanina. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la extracción obtenida tras el tratamiento de la remolacha en medios de conductividad 0,5, 1 y 1,5 mS/cm, se observa una tendencia que indica que al aumentar la conductividad de 0,5 a 1 mS/cm aumenta alrededor de un 10 % la cantidad total de betanina extraída y, que nuevos incrementos de conductividad no incrementaron el efecto.

Cuanto mayor es la resistencia de la cámara de tratamiento y, por lo tanto, menor la conductividad del medio de tratamiento, menor es la energía que se requiere para generar el campo eléctrico. En este caso, al aplicar el tratamiento a una conductividad de 0,5 mS/cm, el consumo energético (0,11 kJ/kg) fue 3 veces inferior al que se requirió para aplicar el mismo tratamiento en el medio de conductividad 1,5 mS/cm (0,34). Por otra parte, al disminuir la conductividad de 1,5 mS/cm a 1 mS/cm se redujo la energía del tratamiento 1,5 veces. Por lo tanto, el gasto energético del tratamiento se podría reducir 1,5 veces disminuyendo la conductividad de 1,5 a 1 mS/cm sin afectar al

rendimiento de la extracción de betanina y, tres veces disminuyendo la conductividad hasta 0,5 mS/cm con una pérdida de rendimiento del 10%.

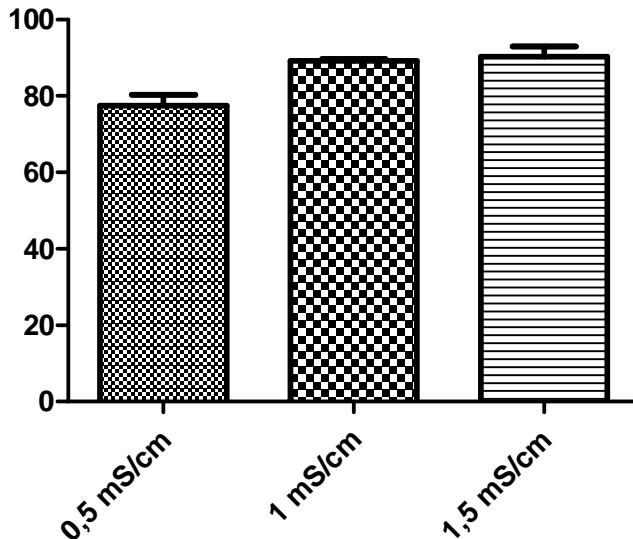


Figura 12. Influencia de la conductividad del medio de tratamiento en el que se trató la remolacha en la extracción de betanina de la remolacha roja.

Por otro lado, la temperatura a la que se aplica el tratamiento de PEAV es otro factor que influye de manera importante en la electroporación celular. Distintos autores (Saldaña et al., 2014; Timmermans et al. 2014), han demostrado que la electroporación es más efectiva al aumentar la temperatura relacionándose este efecto con la mayor fluidez de las membranas celulares a mayor temperatura. Debido a que en un proceso industrial, la temperatura de la remolacha puede variar en función de la época del año o de las condiciones de almacenamiento, antes del tratamiento se decidió investigar la influencia de este factor.

La figura 13 muestra el efecto de la temperatura de la remolacha en la extracción total de betanina. De nuevo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la extracción total de betanina a las tres temperaturas investigadas. Sin embargo, también se observó una tendencia que indicaba que cuando el tratamiento se aplicó a 7°C el rendimiento disminuyó alrededor de un 10% respecto al que se obtuvo al aplicar el tratamiento a 18 y 25°C. Debido a que el cambio de temperatura apenas afectó al consumo energético del tratamiento, estos resultados indicarían que sería más adecuado aplicar el tratamiento a la temperatura más elevada posible.

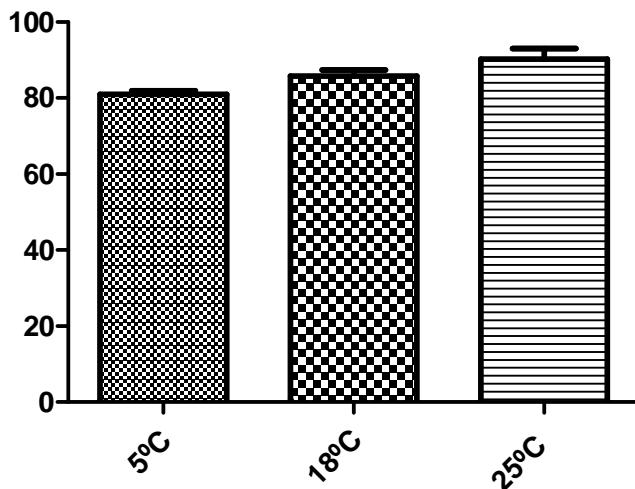


Figura 13. Influencia de la temperatura del medio de tratamiento en el que se trató la remolacha en la extracción de betanina de la remolacha roja.

5.6 INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO DE PEAV EN LA FUERZA REQUERIDA PARA CORTAR LA REMOLACHA ROJA

Es conocido que la electroporación de las células de un tejido vegetal provoca un ablandamiento del mismo debido a que la salida del líquido intracelular a través de los poros formados disminuye la turgencia de las células. Como la remolacha se trituró tras aplicar el tratamiento de PEAV, se decidió estudiar si los tratamientos aplicados ablandaban la remolacha, lo que facilitaría su posterior triturado y por lo tanto el consumo energético del mismo.

Debido a que fuerza de corte podría estar influenciada por la zona de la remolacha se realizó el corte en la zona central y en los extremos de un cilindro obtenido de la remolacha con un sacabocados, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, y se comparó la fuerza que se necesitó para cortar cilindros de remolacha sin tratar y tratada por PEAV con las condiciones de tratamiento que se establecieron como más adecuadas para obtener la máxima extracción de betanina (1 kV/cm-1000 μ s y 1,5 kV/cm-100 μ s).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la fuerza de corte entre las tres zonas del cilindro, ni cuando se aplicaron pulsos de distinta anchura. Por ello, la

figura 5.7 compara los valores medios correspondientes a la muestra control (sin tratar) y tratada por PEAV de 1 kV/cm-1000 μ s y 1,5 kV/cm-100 μ s.

Se observa que la fuerza necesaria para cortar la remolacha era menor en las muestras tratadas por PEAV que en la muestra control. En este caso, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las muestras tratadas por PEAV y entre las dos muestras tratadas por PEAV. Por lo tanto el tratamiento aplicado a la mayor intensidad de campo eléctrico (1,5 kV/cm), que se correspondía con el de menor energía, era con el que se consiguió el mayor ablandamiento de la remolacha.

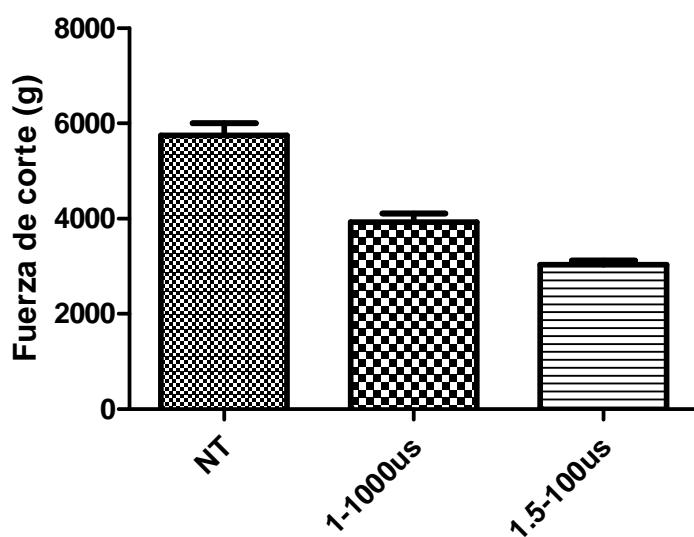


Figura 14. Valores medios de la fuerza necesaria para el corte de los cilindros de la remolacha roja.

La fuerza de corte para cortar la remolacha tratada con este tratamiento era prácticamente la mitad que la que se necesitaba para cortar la remolacha sin tratar. Este resultado, apoya que el tratamiento de 1,5 kV/cm durante 100 μ s sería el más adecuado en un procesado industrial pues aunque el rendimiento de la extracción obtenido es ligeramente inferior al obtenido con el tratamiento de 1 kV/cm durante 100 μ s, el coste energético del mismo y la fuerza necesaria para el corte tras el tratamiento son menores.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento de la remolacha roja entera por PEAV resultó ser eficaz para electroporar sus células y mejorar posteriormente la extracción de betanina.
- El efecto del tratamiento por PEAV en la extracción de betanina de la remolacha fue función de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo total de tratamiento y no dependió de la anchura del pulso.
- A diferencia de la curva de extracción de betanina de remolacha roja sin tratar, las curvas de extracción de la betanina en la remolacha tratada por PEAV se ajustaron a un modelo matemático que asume la existencia de dos cinéticas de primer orden: una que describe la salida de betanina por lavado y otra por difusión.
- Considerando como criterios, además del rendimiento de extracción de betanina, el tiempo total de tratamiento y su energía específica, el tratamiento aplicado a 1,5 kV/cm durante 100 μ s resultó ser el más apropiado.
- La temperatura de aplicación de los PEAV y la conductividad del medio donde se trató la remolacha no influyó significativamente en la extracción de betanina.
- El tratamiento de PEAV a la remolacha entera disminuyó significativamente la fuerza necesaria para su posterior corte lo que representaría una ventaja adicional en el proceso de extracción a partir de la remolacha triturada.

6. CONCLUSIONS

- The treatment of the entire beetroot by PEAV was effective to electroporate its cells and enhance subsequent extraction of betanine.
- The effect of PEF in the extraction of betanine from the red beetroot depended on the intensity of the electric field and the total treatment time, whereas it did not depend on the pulse width.
- Contrary to the extraction of betanine from the untreated beetroot, the extraction curves of betanine from the PEF treated beetroot were correctly fitted to a mathematical model assuming two different first-order kinetics: one describing a washing step and other a diffusion step.
- Considering as criteria the betanin yield extraction, the total treatment time and specific Energy, the treatment applied at 1.5 kV/cm for 100 μ s resulted the most appropriated.
- The temperature of application of PEF treatments and the conductivity of the treatment medium showed no significative influence in the extraction of betanine.
- The PEF treatment of the whole red beetroot reduced significantly the cutting force required to cut the beetroots, therefore this represents an additional advantage in the process of betanine extraction from the blended beetroot.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. *Springer Science & Business Media*.
- Alvarado, J. D. D., & Aguilera, J. M. (2001). Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos (No. TX541. M47 2001).
- Álvarez I, Aleixandre JL, García MJ, Lizama V (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* 563:109-115
- Álvarez I, Condón S, Raso J (2006). Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields, En: J Raso y V Heinz (Eds) *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*, Springer US, Nueva York, 97-129.
- Bazhal, M., & Vorobiev, E. (2000). Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1668-1674.
- Bouzrara, H., & Vorobiev, E. (2000). Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *International Sugar Journal*, 102(1216), 194-200.
- Bouzrara, H., & Vorobiev, E. (2003). Solid–liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric field. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(4), 249-257.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of food Engineering*, 59(4), 379-389.
- Chalermchat, Y., Fincan, M., & Djmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment: Mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 64, 229–236.
- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (1997). Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1097-1102.

- Donsì, F., Ferrari, G., Fruilo, M., & Pataro, G. (2010). Pulsed electric field-assisted vinification of Aglianico and Piedirosso grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11606-11615.
- El Belghiti, K., & Vorobiev, E. (2004). Mass transfer of sugar from beets enhanced by pulsed electric field. *Food and Bioproducts Processing*, 82(3), 226-230.
- Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (2002). High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 265-272.
- Flaumenbaum, B. L. (1968). Anwendung der Elektroplasmolyse bei der Herstellung von Fruchtsäften. *Flüssiges Obst*, 35, 19-22.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 645-649.
- Henry, B.S. (1992). "Natural Food Colours". En: Natural Food Colorants. Ed. Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. (pp 40-79). Blackie and Son Ltd. Glasgow and London.
- J Raso y V Heinz (Eds) Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry, Springer US,
- Kazaki, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S.J., Emam-Djomeh, Z., Yamini, Y. (2007). Supercritical fluid extraction of flavors and fragances from *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Iran. *Food Chemistry*. 105, 805-811.
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: a review. *Food chemistry*, 197, 1280-1285.
- Khan, M. I., & Giridhar, P. (2014). Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 649-657.
- Knorr, D., & Angersbach, A. (1998). Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 185-191.
- Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavčič, D., & Tarek, M. (2012). Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, 28(5), 14-23.

Loginova, K. V., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2011). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 127-133.

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 60-66.

Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Effect of pulsed electric field treatments on permeabilization and extraction of pigments from Chlorella vulgaris. *The Journal of membrane biology*, 247(12), 1269-1277.

Luengo, E., Martínez, J. M., Álvarez, I., & Raso, J. (2016). Effects of millisecond and microsecond pulsed electric fields on red beet cell disintegration and extraction of betanines. *Industrial Crops and Products*, 84, 28-33.

Noonan, J. E., Meggos, H., & Furia, T. E. (1980). Synthetic food colors. *Handbook of Food additives*, 2, 339-383.

Paciulli, M., Medina-Meza, I. G., Chiavaro, E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Impact of thermal and high pressure processing on quality parameters of beetroot (*Beta vulgaris L.*). *LWT-Food Science and Technology*, 68, 98-104.

Puértolas Gracia, E., 2010. Aplicación de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje al Proceso de Vinificación. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Puértolas, E., López, N., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering*, 98(1), 120-125.

Real Decreto 1465/2009, de 18 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios. Boletín oficial del Estado, 8 de octubre de 2009, núm. 243, pp 84828-84873.

Real Decreto 2001/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín oficial del Estado*, 23 de enero de 1996, núm. 19, pp 1884 a 1895.

- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Saldaña, G., Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2014). Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(11), 1415-1426.
- Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A., & Carle, R. (2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 127-134.
- Schilling, S., Schmid, S., Jager, H., Ludwig, M., Dietrich, H., Toepfl, S., & Carle, R. (2008). Comparative study of pulsed electric field and thermal processing of apple juice with particular consideration of juice quality and enzyme deactivation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4545-4554.
- Pérez-Santos, D. M., Velazquez, G., Canonico-Franco, M., Morales-Sánchez, E., Gaytan-Martínez, M., Yañez-Limon, J. M., & Herrera-Gomez, A. (2016). Modeling the limited degree of starch gelatinization. *Starch-Stärke*.
- Timmermans, R. A. H., Groot, M. N., Nederhoff, A. L., van Boekel, M. A. J. S., Matser, A. M., & Mastwijk, H. C. (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. *International journal of food microbiology*, 173, 105-111.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, LL. Bates, D. (2007). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Vorobiev, E., Jemai, A. B., Bouzrara, H., Lebovka, N. I., & Bazhal, M. I. (2005). Pulsed electric field assisted extraction of juice from food plants. *Novel food processing technologies*, 105-130.
- Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., & Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products

and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 46-55.

Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S. (2007). Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradise* Macf) seeds. *Food Chemistry* 105, 1026-1031.