

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“DESARROLLO DE SUSTITUTIVOS DE
GRASA ANIMAL ENRIQUECIDOS CON
 β -CAROTENOS”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

SARA MAGADÁN CHAMORRO

JULIO, 2019



AGRADECIMIENTOS

Agradecer, en primer lugar, a mis tutores de proyecto, Manuel Rendueles de la Vega e Ismael Marcet Manrique, por la confianza depositada en mí y por su dedicación y aportaciones durante la realización de Trabajo Fin de Máster.

A Shihan, por la ayuda prestada y por estar siempre dispuesto a ello.

A mis compañeros, por las horas compartidas dentro y fuera del laboratorio.

Y a mis padres, por su apoyo y consejo.

Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	4
2.1. Sustitutivos de grasa.....	4
2.1.1. Carragenato	5
2.1.2. Inulina.....	7
2.1.3. Proteínas de plasma bovino.....	8
2.2. Grasa animal/aceite vegetal.....	8
2.3. Carotenoides.....	10
2.4. Carotenoides en la yema de huevo.....	12
2.5. Fracciones de la yema de huevo.....	12
2.6. Extracción de carotenoides.....	14
2.7. Diseño experimental: Box-Behnken	15
3. METODOLOGÍA	18
3.1. Síntesis del sustitutivo de grasa.....	18
3.2. Texturometría	19
3.3. Pérdida de masa.....	19
3.4. Separación de las fracciones de la yema de huevo.....	20
3.5. Extracción de carotenoides.....	20
3.6. Diseño experimental.....	22
3.7. Proteínas	23
3.8. Determinación de propiedades antioxidantes.....	23
3.9. Medición del color	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Ensayos previos del sustitutivo de grasa.....	25
4.2. Caracterización del sustitutivo de grasa	31
4.3. Extracción de carotenoides.....	36
4.3.1. Extracción de carotenoides de yema de huevo.....	36
4.3.2. Extracción de carotenoides del plasma	43
4.3.3. Extracción de carotenoides de los gránulos	49
4.3.4. Extracción de carotenoides de la yema de huevo y sus fracciones. Discusión.	56
4.4. Determinación de proteínas.....	57
4.5. Determinación de la capacidad antioxidante.....	57
4.6. Caracterización del sustitutivo de grasa con β -carotenos.....	58

5. CONCLUSIONES.....	64
6. BIBLIOGRAFÍA.....	65

RESUMEN

El incremento en la prevalencia de la obesidad a nivel mundial unido a la creciente preocupación de la sociedad por la salud hace que cada vez se le dé una importancia mayor a la alimentación.

Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo es desarrollar un sustitutivo de grasa con β -carotenos procedentes de yema de huevo, de modo que no solo se consigue reducir la cantidad de un componente perjudicial para la salud cuando se ingiere en abundancia, como es la grasa, sino que también se introduce un compuesto beneficioso para el organismo, como son los carotenoides.

Para la síntesis del sustitutivo de grasa se emplean carragenato, que es el agente gelificante, agua, y aceite vegetal o grasa animal o una combinación de ambas sustancias. Los estudios realizados muestran que la composición que presenta las mejores propiedades tanto en cuanto a la pérdida de masa como en cuanto a la fuerza del gel, son los sustitutivos que contienen un 5% de carragenato, y la totalidad de la fracción destinada a aceite vegetal o a grasa animal ocupada con aceite de girasol.

También aceite de girasol es la sustancia empleada para realizar la extracción de carotenoides de yema de huevo, analizándose mediante un diseño experimental Box-Behnken la influencia que la temperatura, el tiempo, y la velocidad de agitación ejercen sobre el proceso. Los resultados obtenidos indican que todos estos parámetros se encuentran directamente relacionados con la concentración de β -carotenos equivalentes obtenida, siendo esta mayor a medida que aumenta el valor de cada uno de ellos. Además, se observa que estos compuestos no se encuentran repartidos por igual en las dos fracciones de la yema, plasma y gránulos, sino que principalmente se localizan en el plasma.

Empleando el aceite con carotenoides resultante de la extracción para sintetizar el sustitutivo de grasa se consiguen unir ambas ventajas, generándose de este modo un producto más saludable y atractivo para el consumidor.

ABSTRACT

The increase in the prevalence of obesity worldwide, together with the growing concern for health of the society, are giving food greater importance.

According to this, the main objective of this work is to develop a fat replacer with β -carotenes obtained from egg yolk, so that the amount of a harmful component is reduced, the fat, and a beneficial compound is incorporated, the carotenoids.

The fat replacer is synthesized using carrageenan as gelling agent, water, and vegetable oil or animal fat or a combination of both substances. Studies show that the composition that has the best properties both in terms of mass loss and in terms of gel strength, are the fat replacers containing 5% of carrageenan and sunflower oil in all the fraction destined for vegetable oil or animal fat.

This sunflower oil is also used to extract carotenoids from egg yolk, and through an experimental design Box-Behnken, the influence of temperature, time and speed in the process are analyzed. The results indicate that all these parameters are directly related to the concentration of equivalent β -carotenes obtained. Furthermore, it is observed that these compounds are not equally distributed in the two fractions of the yolk, plasma and granules, but they are mainly located in the plasma.

By using oil containing carotenoids from the extraction to synthesize the fat replacer, both advantages are united, generating a healthier and more attractive product for the consumer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alga roja de la clase Rhodophyceae de la que se obtiene carragenato.	6
Figura 2. Alimentos en los que se ha empleado carragenato como sustitutivo de grasa: queso Oaxaca (izquierda) y hamburguesas de carne de cabra (derecha).	7
Figura 3. Raíz de achicoria, de donde se extrae inulina.	7
Figura 4. Fórmulas químicas del tocoferol y del tocotrienol con sus respectivos homólogos [33].	9
Figura 5. Fórmulas químicas de algunos de los carotenoides más comunes [5].	11
Figura 6. Muestras resultantes de la liofilización de: yema completa (izquierda), plasma (centro) y gránulos (derecha).	13
Figura 7. Diseño experimental Box-Behnken para el estudio de tres variables en tres niveles [26].	16
Figura 8. Matriz experimental del diseño Box-Behnken para el estudio de tres variables en tres niveles [26].	17
Figura 9. Carragenato empleado para la realización de los geles del sustitutivo de grasa (marca Prosella).	18
Figura 10. Sonda cilíndrica P20 utilizada para analizar en el texturómetro los geles. ...	19
Figura 11. Espectrofotómetro empleado para cuantificar la cantidad de carotenoides presentes en las muestras.	21
Figura 12. Equipos empleados para establecer las condiciones de la extracción: vaso conectado a baño de temperaturas (izquierda) y homogeneizador Silent Crusher (derecha).	22
Figura 13. Colorímetro Lovibond utilizado para medir los diferentes parámetros del color de los sustitutos de grasa.	25
Figura 14. Comparación de la consistencia de las muestras con un 1% de carragenato (izquierda) y un 3% de carragenato (derecha).	27
Figura 15. Comparación de la fuerza de los geles antes y después del baño (5 °C y 50 °C).	28
Figura 16. Resto de carragenato resultante después de la evaporación del exudado de la muestra preparada con un 3% de carragenato.	30
Figura 17. Efecto de la composición en la fuerza del gel a 5°C.	35
Figura 18. Efecto de la composición en la fuerza del gel a 90 °C.	36

Figura 19. Recta patrón de la absorbancia (450nm) en función de la concentración de β -carotenos ($\mu\text{g/ml}$).....	37
Figura 20. Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), velocidad de giro (rpm), y tiempo (min) en la extracción de β -carotenos de yema de huevo.	41
Figura 21. Gráficas de superficie de respuesta de β -carotenos equivalentes frente a: velocidad y temperatura (A), tiempo y temperatura (B), y tiempo y velocidad (C).	42
Figura 22. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/mL}$) extraídos de yema de huevo. La temperatura se ha fijado a $27,5^{\circ}\text{C}$	44
Figura 23. Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la velocidad de giro (rpm), y el tiempo (min) en la extracción de β -carotenos equivalentes del plasma de la yema de huevo.	46
Figura 24. Efecto en la extracción de β -carotenos de plasma de: tiempo y velocidad (A), tiempo y temperatura (B), y velocidad y temperatura (C).	48
Figura 25. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/mL}$) extraídos de plasma. La temperatura se ha fijado a $27,5^{\circ}\text{C}$	49
Figura 26. Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), velocidad de giro (rpm), y tiempo (min), en la extracción de β -carotenos equivalentes de los gránulos de la yema de huevo.	53
Figura 27. Grafica de superficie de concentración de β -carotenos frente a: tiempo y velocidad (A), velocidad y temperatura (B), y tiempo y temperatura (C).....	55
Figura 28. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/mL}$) extraídos de los gránulos. La temperatura se ha fijado a $27,5^{\circ}\text{C}$	56
Figura 29. Aceite resultante de la extracción de β -carotenos de yema de huevo (izquierda), plasma (centro), y gránulos (derecha).....	59
Figura 30. Sustitutivos de grasa con las diferentes muestras de aceite: blanco (1), yema 100% (2), yema 50% (3), plasma 100% (4), plasma 50% (5), gránulos 100% (6), y gránulos 50% (7).	61
Figura 31. Sustitutivos de grasa con β -carotenos procedentes de la extracción a partir de yema de huevo completa (izquierda) y de plasma (derecha).....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la cantidad de carragenato en la fuerza de los geles.....	26
Tabla 2. Efecto de la temperatura (50 °C) en la fuerza de los geles con concentraciones de carragenato desde el 1,5% al 5%.	28
Tabla 3. Efecto en la dureza de los geles y en la pérdida de masa de la temperatura (90 °C).....	29
Tabla 4. Efecto de la composición en la fuerza y en la pérdida de masa de los geles....	31
Tabla 5. Efecto de la composición en la pérdida de masa de los geles.	33
Tabla 6. Valores de la extracción de β -carotenos en las diferentes condiciones.....	38
Tabla 7. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos de yema de huevo.	40
Tabla 8. Extracción de β -carotenos del plasma de la yema de huevo.	45
Tabla 9. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos del plasma de la yema de huevo.	47
Tabla 10. Extracción de β -carotenos de los gránulos de la yema de huevo.	51
Tabla 11. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos de los gránulos de la yema de huevo.	54
Tabla 12. Porcentaje de nitrógeno y de peso de proteína en las muestras antes y después de realizar la extracción de carotenoides.....	58
Tabla 13. Medición de color antes y después del baño.	60

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en la prevalencia de la obesidad a nivel mundial, unido a la creciente preocupación de la sociedad por la salud, hacen que cada vez se le dé una importancia mayor a la dieta.

A la hora de desarrollar alimentos más saludables existen dos opciones. En primer lugar, se puede optar por reducir el nivel de sustancias no deseables, y en segundo lugar, se puede incrementar la cantidad de componentes beneficiosos [1].

Centrándonos en la primera opción, una estrategia ya consolidada en el sector alimentario consiste en la reducción de la grasa presente en los alimentos. Esta disminución en la cantidad de grasa se puede llevar a cabo mediante el empleo de un sustitutivo de grasa, que se define como un ingrediente que se utiliza para proporcionar o bien todas o bien algunas de las funciones de la grasa, pero con un contenido calórico menor [2]. Productos como carnes, productos horneados y productos lácteos ya contienen estos sustitutivos de grasa en su composición [2].

De los diversos sustitutivos de grasa conocidos, un grupo interesante son aquellos que actúan como agentes gelificantes, y que mediante la unión con agua forman geles que mimetizan la textura y la viscosidad de las grasas [2]. Dentro de este grupo se encuentra el carragenato, que es un polisacárido compuesto de residuos de α -D-Galactosa y β -D-Galactosa obtenido a partir de algas rojas [3].

Al incorporar el sustitutivo de grasa en un alimento, no siempre se elimina completamente la materia grasa del mismo, sino que un porcentaje puede permanecer o bien como grasa animal, o bien sustituido parcial o totalmente por un aceite vegetal. El empleo de aceites vegetales como el aceite de girasol permite que el alimento presente un contenido de ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados mayor que la grasa animal, y una menor cantidad de ácidos grasos saturados, por lo que resulta más beneficioso para la salud.

Teniendo en cuenta todo esto, utilizando carragenato como sustitutivo de grasa y empleando aceite de girasol para añadir a los geles y reducir aún más el contenido de grasa animal que va a ser introducido en las muestras, se consigue una disminución en la cantidad de grasa y una mejora en la composición de ácidos grasos, todo ello sin afectar negativamente a la calidad del producto final [4].

Por otra parte, la mejora de las propiedades nutricionales de un alimento mediante la introducción de algún componente beneficioso en el mismo también resulta muy interesante. En concreto, al introducir una cantidad de aceite de girasol en el sustitutivo de grasa, se puede aprovechar ese aceite para incorporar en él alguna sustancia que ejerza un efecto positivo para la salud.

Los carotenoides son pigmentos naturales con colores característicos que van desde el amarillo hasta el rojo. Se clasifican en dos grupos de acuerdo a su función: xantofilas, donde se encuentran la luteína y la zeaxantina, y carotenos, como el α -caroteno, el β -caroteno y el licopeno. En ningún caso son sintetizados por el cuerpo humano, por lo que únicamente son adquiridos mediante la dieta [5].

El hecho de que los carotenoides sean incorporados solamente por la alimentación, unido al importante papel que estos juegan en la prevención de enfermedades humanas y en el mantenimiento de la salud, los convierte un candidato ideal para su introducción en el sustitutivo de grasa [5]. Se sabe que este grupo de compuestos bioactivos presenta efectos tanto antiinflamatorios como antioxidantes, lo que les confiere un papel fundamental mediando los efectos perjudiciales de los radicales libres y potenciando la protección frente al envejecimiento prematuro, ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc [5].

Las frutas y las verduras son las principales fuentes de compuestos bioactivos como los carotenoides en la dieta, sin embargo, la biodisponibilidad de estos carotenoides en vegetales es pobre [6]. En el caso de la luteína, la zeaxantina, y los β -carotenos, también se encuentran en la yema de huevo, donde además presentan una biodisponibilidad elevada, por lo que es mejor emplear esta fuente para su extracción [6]. Las gallinas incorporan en su dieta vegetales ricos en carotenoides y son capaces de acumularlos en la yema de huevo de manera muy eficiente, lo que confiere el rango de colores desde el amarillo hasta el naranja a la yema [5]. Además, hay que tener en cuenta que la yema de huevo puede ser separada en dos fracciones de manera muy sencilla. Estas fracciones son la plasmática, rica en lípidos y formada principalmente por lipoproteínas de baja densidad, y la fracción granular, constituida principalmente por proteínas y con un contenido en lípidos menor que la otra fracción. Estas dos fracciones tienen propiedades funcionales y nutricionales bien diferenciadas, por lo que resulta adecuado explorar las características de la extracción de carotenoides para cada una de ellas, y así no consumir

toda la yema de huevo en el proceso, sino sólo aquella fracción que resulte más conveniente.

Cabe señalar que los carotenoides no solamente le generan un valor añadido al sustitutivo de grasa por sus propiedades beneficiosas para la salud, sino que también van a mejorar el aspecto del sustitutivo al aportarle una tonalidad amarillenta que contrarresta el color blanco del carragenato y lo convierte en más atractivo para el consumidor en algunas aplicaciones.

Por tanto, la síntesis de un sustitutivo de grasa con carotenoides de yema de huevo es una opción con un gran potencial económico, tanto por el efecto beneficioso que ejerce en la salud de los consumidores, como por la creciente tendencia al empleo de pigmentos vegetales como antioxidantes de procedencia natural, que mejoran la calidad y aumentan la vida media de los productos en los que se introducen [5].

En este trabajo, se llevará a cabo la extracción de los carotenoides de la yema de huevo empleando aceite de girasol para ser introducido posteriormente en el sustitutivo de grasa. Se realizará y se modelizará la extracción tanto de la yema entera como de sus fracciones, y finalmente se caracterizarán los sustitutivos que se preparen.

Por tanto, los **objetivos** que se pretenden alcanzar en este trabajo son los siguientes:

- Sintetizar un sustitutivo de grasa con carragenato como agente gelificante.
- Determinar la proporción óptima de grasa animal/aceite vegetal a introducir en el sustitutivo de grasa.
- Extraer los carotenoides de la yema de huevo y de sus fracciones en aceite de girasol utilizando un homogeneizador de laboratorio a diferentes temperaturas. Modelizar el proceso de extracción empleando un diseño experimental Box-Behnken.
- Incorporar el aceite con carotenoides en el sustitutivo de grasa, y evaluar sus propiedades colorimétricas.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1. Sustitutivos de grasa

La grasa juega un papel fundamental en las propiedades sensoriales de los alimentos, sin embargo, un consumo excesivo puede provocar ganancia de peso. En la actualidad, la prevalencia del sobrepeso y de la obesidad en la sociedad es cada vez mayor, y en consecuencia de estas patologías, se incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, y algunos tipos de cáncer [2].

Para responder a las recomendaciones de las autoridades sanitarias y a la demanda por parte de los consumidores de productos más saludables, en algunos alimentos se ha eliminado parte de la grasa creando un producto “bajo en grasas”, sin embargo, estas alternativas generalmente presentan peores propiedades sensoriales y una menor aceptación en el mercado.

Los sustitutivos de grasa surgen para solucionar este problema, se trata de sustancias que reducen el contenido graso de los alimentos, pero manteniendo las propiedades que se le atribuyen. Se clasifican en dos categorías [2]:

- Sustituto de grasa → sustancias que presentan las mismas propiedades sensoriales y funcionales que la grasa con un contenido energético menor. Se emplean para reemplazar parcial o totalmente la grasa que contiene el alimento original.
- Mimético de grasa → sustancias compuestas de proteínas o carbohidratos que no sustituyen por completo la grasa presente en el alimento, pero que imitan algunas de las propiedades que esta proporciona.

Gran cantidad de productos de la industria alimentaria emplean estos sustitutivos de grasa para conseguir reducir la ingesta energética, pero sin perder la aceptación del consumidor. Entre los sectores que ya utilizan esta estrategia se encuentran el cárnico, el lácteo, y el de los productos horneados.

La amplia variedad de sustitutivos de grasa existentes se puede clasificar en función de varias características, como por ejemplo su composición, su estructura, sus funciones, etc. Sin embargo, una clasificación muy interesante es la que se realiza en función de sus aplicaciones industriales [2]:

- Carbohidratos complejos → Sustitutivos de grasa que se unen al agua formando una pasta que imita la textura y viscosidad de la grasa. En este grupo se encuentran la inulina y la maltodextrina.
- Gomas y geles → al igual que en el caso anterior, estos sustitutivos se unen al agua formando un gel que imita la textura y la viscosidad de la grasa. Pueden estar constituidos tanto por carbohidratos complejos, como por proteínas o por sustancias derivadas de la grasa. En este grupo están las pectinas, los oleogeles, las proteínas del suero, y el carragenato.
- Alimentos completos → se emplea un alimento entero o una parte del mismo para introducirlo en un producto como sustitutivo. Frutas, verduras, legumbres y cereales son algunos de los alimentos que se han utilizado con este fin. Por ejemplo, el aguacate gracias al aceite que tiene en su composición, genera en el producto final una textura cremosa.
- Combinaciones → se pueden combinar los sustitutivos de modo que se imita un mayor número de propiedades de la grasa, consiguiéndose un efecto sinérgico. En este grupo estarían las emulsiones y los esterres.

2.1.1. Carragenato

Una de las sustancias que se emplea como agente gelificante para constituir un sustitutivo de grasa es el carragenato.

El carragenato es un polisacárido compuesto de α -D-Galactosa y β -D-Galactosa que se obtiene a partir de algas rojas [3]. Su producción global se estima entre unas 70,000 y 110,000 MT al año, y se distinguen tres tipos en función del número y de la posición de los grupos sulfato que contienen: kappa-carragenato, iota-carragenato, y lambda-carragenato [7]. Mientras que el lambda-carragenato se utiliza como espesante, el kappa-carragenato y el iota-carragenato tienen capacidad de formación de geles [8].

En la Figura 1 se muestra la fotografía de un alga roja característica, a partir de la cual se extrae carragenato de manera habitual en la industria alimentaria.



Figura 1. Alga roja de la clase Rhodophyceae de la que se obtiene carragenato.

Dada la capacidad gelificante del carragenato, cuando se mezcla con agua da lugar a un gel que simula las características de la grasa, respondiendo de este modo a la demanda de los consumidores de productos más saludables.

Nayak et al. (2016), ya incorporaron carragenato en hamburguesas de carne de cabra de modo que conseguían reducir su contenido en materia grasa. La eficacia del carragenato como sustitutivo de grasa quedó demostrada en este trabajo, y además, se observó que cuanto mayor era la cantidad de este gelificante añadida, mayor era la estabilidad de la emulsión y el rendimiento en el cocinado [4].

Otro ejemplo del empleo del carragenato en la industria alimentaria fue el estudio realizado por Totósaus et al. (2017). En este caso, diferentes carragenatos fueron introducidos en queso Oaxaca, de origen mejicano. No solamente se consiguió una mejora en las propiedades nutricionales del queso al reducir la cantidad de grasa, sino que también se observó como la interacción específica entre el carragenato y las proteínas de la leche provocaba un área de extensión mayor al fundir el queso, y además, una mejora en las propiedades texturales del mismo, en concreto un aumento en su suavidad y su adhesividad [9].

En la figura adjunta se muestran imágenes de algunos de los alimentos en los que se ha empleado el carragenato como sustitutivo de grasa (Figura 2).



Figura 2. Alimentos en los que se ha empleado carragenato como sustitutivo de grasa: queso Oaxaca (izquierda) y hamburguesas de carne de cabra (derecha).

2.1.2. Inulina

Otro compuesto que se emplea en la industria alimentaria como sustitutivo de grasa es la inulina. La inulina designa a una familia de glúcidos complejos constituidos de cadenas de fructosa, que son solubles en agua, y que se pueden obtener a partir de gran cantidad de plantas, si bien las raíces de achicoria son la fuente más rica de este compuesto (Figura 3) [10].



Figura 3. Raíz de achicoria, de donde se extrae inulina.

La inulina no solamente se emplea como sustitutivo de grasa en la industria alimentaria, sino que también se aprovechan sus funciones como prebiótico, sustitutivo de azúcar, modificador de la textura y en el desarrollo de alimentos funcionales debido al papel beneficioso que ejerce en la salud gástrica [10].

La utilización de la inulina como sustitutivo de grasa puede realizarse ya que esta sustancia, en presencia de agua, da lugar a la formación de un gel que genera en la boca una sensación similar a la de la grasa [10].

En queso de cabra, la adición de inulina en concentraciones desde el 2% hasta el 7% como sustitutivo, además de la mejora en las propiedades nutricionales, hace que la textura resultante sea más cremosa [10].

En carne picada también se ha empleado este compuesto, y unido a una reducción en la grasa del 20% al 35%, se comprobó que no se producían diferencias ni en el color ni en el sabor de los productos finales [11].

2.1.3. Proteínas de plasma bovino

Rodríguez et al. (2013) vieron que en carne picada los resultados obtenidos para el análisis sensorial eran mejores cuando, además de inulina, se añadían proteínas de plasma bovino [11].

Las proteínas de plasma bovino se han propuesto como potenciales sustitutos de grasa en carnes debido a sus excelentes propiedades gelificantes. Además, presentan la ventaja de que son relativamente baratas y presentan una gran variedad de propiedades funcionales [12].

Otro ejemplo del empleo de estas proteínas como sustitutivo de grasa se ha realizado en salchichas de bolonia, donde se observa una mejora en la dureza y en la masticabilidad de las estructuras formadas, unida a una mejora en la capacidad de unión al agua [12].

2.2. Grasa animal/aceite vegetal

A la hora de emplear estos sustitutos, no siempre se reemplaza toda la grasa que contiene el alimento, sino que a veces se deja una cantidad, o bien se sustituye parte de la grasa animal por un aceite vegetal.

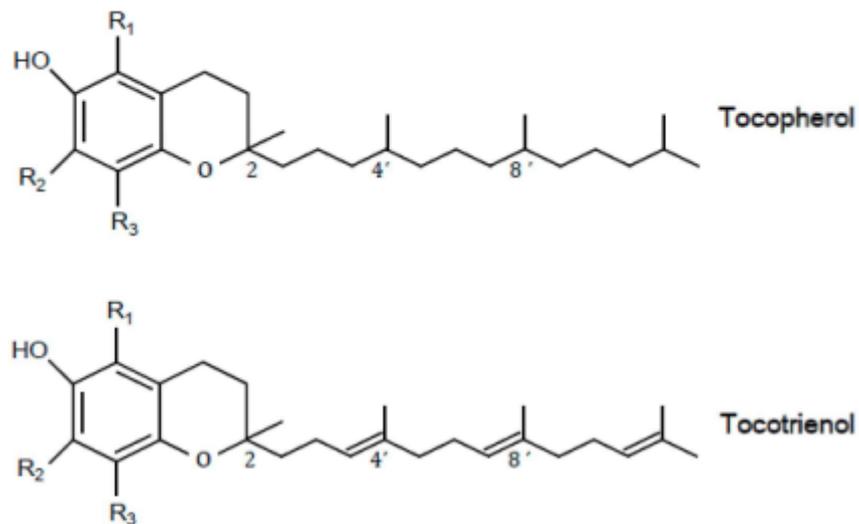
A nivel de salud, obviamente cuanto menor sea el contenido de grasa que permanezca en el alimento mejor, sin embargo, hay que tener en cuenta que todas estas modificaciones deben realizarse sin que se vean afectadas las cualidades del alimento, por lo que no siempre resulta tan sencillo.

Por otra parte, cuando se trata de alimentos en los que se introduce un porcentaje de aceite vegetal, como es el caso del aceite de girasol, en sustitución de la grasa animal, la ingesta calórica también disminuye a medida que aumenta la cantidad de aceite introducido, y por lo tanto de grasa eliminada.

La grasa animal, también conocida como manteca de cerdo, presenta por cada 100 g, 41 g de grasas saturadas. En cuanto al aceite de girasol, por cada 100 ml tiene 91,8 g de lípidos, y de ellos 9,2 g son ácidos grasos saturados. Además, cabe señalar que en el aceite de girasol hay vitamina E, 55 mg por cada 100 ml, lo que supone el 460% de la ingesta diaria recomendada.

El hecho de que el aceite de girasol contenga vitamina E resulta de gran interés para la salud, ya que mediante su introducción en el alimento no solo se consigue reducir la ingesta energética, sino que también se obtienen los beneficios que esta vitamina aporta.

Vitamina E es un nombre colectivo que se le da a un conjunto de compuestos liposolubles, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles (Figura 4) [13]. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, y se sabe que ejercen una actividad antioxidante en los humanos [13]. Además, la vitamina E tiene efectos antiinflamatorios, juega un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares y del cáncer, y actúa como protectora frente a enfermedades neurodegenerativas entre otras [13].



R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-
CH ₃	H	CH ₃	β-
H	CH ₃	CH ₃	γ-
H	H	CH ₃	δ-

Figura 4. Fórmulas químicas del tocoferol y del tocotrienol con sus respectivos homólogos [33].

El menor contenido en grasas saturadas del aceite de girasol frente al de la grasa animal presenta una doble implicación ventajosa para la salud. En primer lugar, dada la relación existente entre una ingesta elevada de ácidos grasos saturados y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, al reducir su cantidad, el riesgo de estas también disminuye. En segundo lugar, el menor contenido en grasas saturadas del aceite se compensa con una mayoría de ácidos grasos poliinsaturados (62% de la grasa), que provocan una disminución en los niveles de colesterol (LDL) [14][15].

2.3. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran en plantas, algas, hongos, aves, y en la cutícula de crustáceos e insectos. Presentan un rango de colores característicos que van desde el amarillo hasta el rojo, y son liposolubles [5].

Dada la naturaleza liposoluble de los carotenoides, estos compuestos se pueden extraer e incorporar en el aceite de girasol, obteniéndose de este modo un aceite con compuestos bioactivos que puede ser introducido en el sustitutivo de grasa.

En la naturaleza se han identificado más de 600 carotenoides distintos, sin embargo, en la dieta humana únicamente aparecen unos 40. En función de si contienen o no oxígeno, los carotenoides se clasifican en dos grupos (Figura 5) [16]:

- Xantofilas → por ejemplo la luteína y la zeaxantina, que contienen oxígeno.
- Carotenos → por ejemplo el α -caroteno, el β -caroteno y el licopeno, sin oxígeno en su composición.

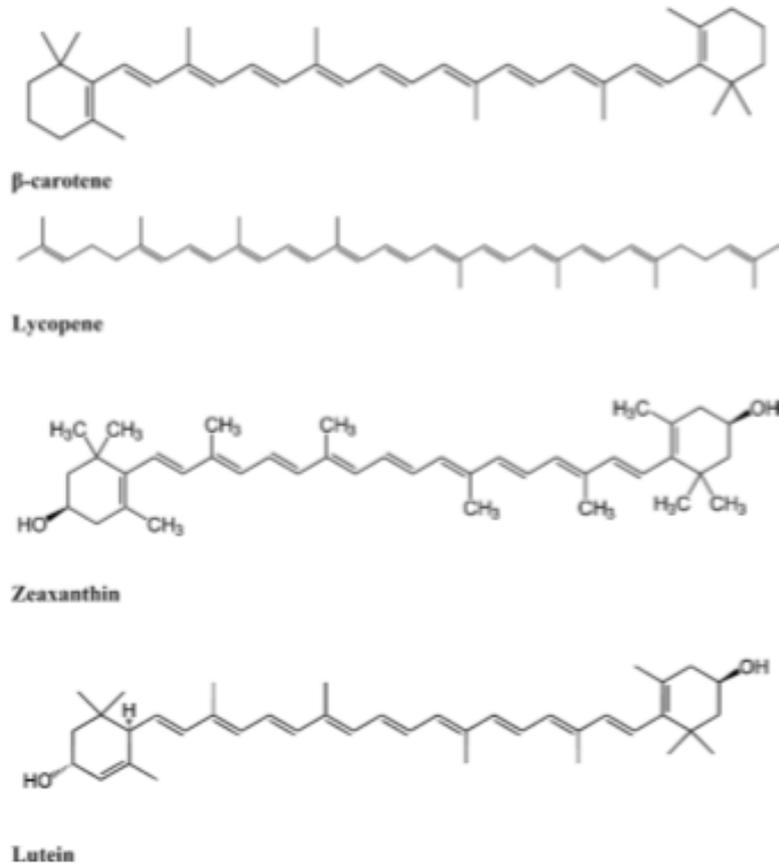


Figura 5. Fórmulas químicas de algunos de los carotenoides más comunes [5].

Los carotenoides son de gran importancia para la industria alimentaria ya que se trata de un grupo de compuestos bioactivos que no son sintetizados ni por humanos ni por animales, por lo que únicamente los adquirimos por la dieta. Además, presentan efectos antiinflamatorios y antioxidantes, y juegan un papel fundamental en la prevención de enfermedades [5].

La capacidad antioxidante que presentan estos compuestos media los daños causados por los radicales libres y potencia la protección del sistema inmunitario frente al envejecimiento prematuro, algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y artritis [5]. Además, cabe señalar que, dado que el aceite de girasol en el que se introducen los carotenoides también tiene propiedades antioxidantes, la capacidad antioxidante del aceite resultante de la extracción va a ser aún mayor.

Las frutas y las verduras son las principales fuentes de carotenoides en nuestra dieta, sin embargo, algunos de estos compuestos también se encuentran en elevadas concentraciones en la yema de los huevos [5].

Por último, señalar que además todos los beneficios que ejercen sobre la salud, los carotenoides también mejoran el aspecto de la comida, consiguiendo que esta resulte más atractiva para los consumidores [5].

2.4. Carotenoides en la yema de huevo

La alimentación de las gallinas con vegetales ricos en carotenoides permite que estos se acumulen de manera muy eficiente en la yema de huevo, aportándole su color anaranjado característico [5]. Además, la biodisponibilidad de estos compuestos bioactivos va a ser mayor en la yema que en las fuentes vegetales [6].

Luteína, zeaxantina y β -carotenos son algunos de los carotenoides más importantes que se acumulan en la yema de los huevos [5].

La luteína y la zeaxantina son estereoisómeros entre sí, y además de la ya nombrada función como antioxidantes, protegiendo del estrés oxidativo, también actúan como filtro de la luz ultravioleta, encontrándose su consumo relacionado con una menor incidencia de cataratas y de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la luteína protege la piel frente a los daños producidos por la luz ultravioleta, puede reducir el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, y aumenta la respuesta inmunitaria. Por su parte los β -carotenos, además de la capacidad antioxidante, intervienen en la prevención tanto de la ceguera nocturna como de la fibrosis hepática [5].

2.5. Fracciones de la yema de huevo

La yema de huevo es una emulsión natural de aceite en agua con un 52% de materia seca. Dentro de esta materia seca, aproximadamente el 65% es grasa, el 31% son proteínas, y el 4% restante incluye carbohidratos, vitaminas, y minerales [17].

La estructura de la yema de huevo es compleja, sin embargo, pueden separarse fácilmente dos fracciones por centrifugación, por un lado el plasma, que es el sobrenadante, y por otro lado los gránulos, que se corresponden con el precipitado (Figura 6) [17].



Figura 6. Muestras resultantes de la liofilización de: yema completa (izquierda), plasma (centro) y gránulos (derecha).

Las dos fracciones existentes en la yema de huevo presentan distinta composición, estructura y sensibilidad a tratamientos mecánico-térmicos, por lo que se puede conseguir un uso más eficiente de las mismas si se trabaja con ellas por separado que trabajando con la yema completa [18].

En cuanto a su composición, los gránulos son agregados de proteínas no solubles, principalmente lipoproteínas de alta densidad (HDLs), fosfovitina y lipoproteínas de baja densidad (LDLs), con un tamaño comprendido entre 0,3 y 2 μm [19]. Estos agregados se encuentran en suspensión en un fluido amarillo que es el plasma [18]. El plasma está constituido por lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y por glicoproteínas globulares, principalmente livetinas [20].

Los gránulos representan aproximadamente el 22% de la materia seca de la yema, y comprenden sobre el 50% de las proteínas y sobre el 7% lípidos de los lípidos totales. El 78% restante está constituido por el plasma, donde se encuentran aproximadamente el 90% de los lípidos y el 50% de las proteínas de la yema [21].

De todas las sustancias con propiedades beneficiosas para la salud y con numerosas aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica, y médica, que contiene la yema de huevo, centrándonos en los carotenoides, es importante conocer en cuál de las dos fracciones están ubicados. Los carotenoides se encuentran principalmente en las LDLs, que aparecen en mayor medida en la fracción plasmática, por lo que, a la hora de realizar su extracción, la cantidad obtenida va ser debida principalmente a la concentración de esta lipoproteína en cada fracción [18].

Como se puede ver en la Figura 6, el hecho de que los carotenoides se encuentren en su mayoría en el plasma provoca que el color de la yema completa y del plasma sea de una tonalidad más amarillenta que el de los gránulos, que presentan un color más pálido.

2.6. Extracción de carotenoides

La extracción de carotenoides de matrices alimentarias se puede realizar por gran variedad de técnicas: extracción por ultrasonidos, microextracción, extracción Soxhlet, extracción por pulsos eléctrico, extracción con enzimas, extracción con fluidos supercríticos, etc [22].

Generalmente, los métodos empleados van a implicar elevadas temperaturas, lo que puede provocar degradación térmica e isomerización de los carotenoides. Para evitar esto, las muestras pueden ser deshidratadas previamente por liofilización [22].

En cuanto a la selección del solvente apropiado, de manera convencional los carotenoides se han extraído con solventes orgánicos como por ejemplo la acetona o el hexano, sin embargo, estas sustancias no resultan seguras ni para la salud ni para el medio ambiente [22]. El empleo de aceite de girasol como fase líquida para la extracción soluciona este problema, ya que se trata de una sustancia que no resulta perjudicial y que además procede de una fuente renovable [23]. El carácter lipofílico de los carotenoides convierte al aceite en un candidato ideal para realizar esta extracción.

La temperatura es un parámetro clave a la hora de realizar la extracción de carotenoides. Estos compuestos son termosensibles, por lo que, si bien la temperatura generalmente afecta de manera positiva al proceso de extracción, una temperatura elevada puede provocar una disminución en la recuperación de carotenoides [24].

Una vez se han extraído los carotenoides, su análisis puede realizarse por cromatografía líquida, cromatografía de capa fina o análisis espectrofotométrico entre otras [22]. Para el caso del espectrofotómetro, la longitud de onda que permite cuantificar estos compuestos es 450nm [16].

Wang et al. (2016) realizaron la extracción de carotenoides de yema de huevo por microextracción. Empleando como solvente una mezcla de 1-octanol y 1-undecanol extrajeron estos compuestos y determinaron, mediante HPLC, la cantidad de luteína y β -carotenos obtenidos [16].

Otro estudio realizado para la extracción de carotenoides sería el de su obtención a partir del alga *Dunaliella salina*. En este caso, los compuestos de interés van a ser extraídos de la fuente mediante la utilización de dióxido de carbono supercrítico, que se elige como solvente debido a la baja polaridad de los carotenoides [25].

2.7. Diseño experimental: Box-Behnken

La extracción de carotenoides de yema de huevo es un proceso que va a depender de múltiples factores. En concreto, la temperatura, el tiempo de extracción y la velocidad de giro a la que se somete la muestra, son tres parámetros que se van a poder controlar de modo que se consigan optimizar las condiciones para la extracción.

Tradicionalmente, la optimización de un proceso se realizaba factor por factor, es decir, manteniendo constantes todos los parámetros salvo uno, ese era modificado de modo que se veía la influencia que su variación ejercía en el proceso. Esta técnica en la que se modifica una única variable cada vez tiene una gran desventaja, ya que no permite detectar las interacciones que pueden existir entre las variables analizadas. Además, el número de experimentos a realizar con este método es elevado, con el consecuente gasto de tiempo y de reactivos que esto implica [26].

En la actualidad se emplean técnicas estadísticas multivariantes, siendo la optimización por la metodología de superficie de respuesta la técnica más utilizada. La metodología de superficie de respuesta o RSM es una colección de técnicas estadísticas y matemáticas basadas en el ajuste de una ecuación polinómica a los datos experimentales. Esta ecuación resultante debe describir el comportamiento de los datos, de modo que permita realizar predicciones [26].

Dentro de la metodología de superficie de respuesta existen diversos diseños experimentales. Los diseños experimentales pueden ser de primer orden, como los diseños factoriales, o de órdenes superiores cuando los datos experimentales no pueden ser descritos con una función lineal. En este último caso se emplean diseños que tengan una superficie de respuesta cuadrática, como el Box-Behnken, el central compuesto o el factorial de tres niveles [26].

De todos estos diseños experimentales, el diseño Box-Behnken es uno de los más empleados ya que permite detectar eficientemente las condiciones críticas, es decir, los

máximos y los mínimos, mediante la realización de un número más reducido de experimentos.

Para tres factores, el diseño Box-behnken consta de una matriz esférica, rotativa, y que vista desde la perspectiva de un cubo consiste en el punto central y los puntos medios de los bordes (Figura 7). En este diseño todas las variables se estudian en tres niveles con el mismo espacio en los intervalos, y el número de experimentos a realizar viene determinado por la siguiente ecuación [27]:

$$N = 2 * k * (k - 1) + Co$$

Donde k es el número de factores y Co el número de puntos centrales.

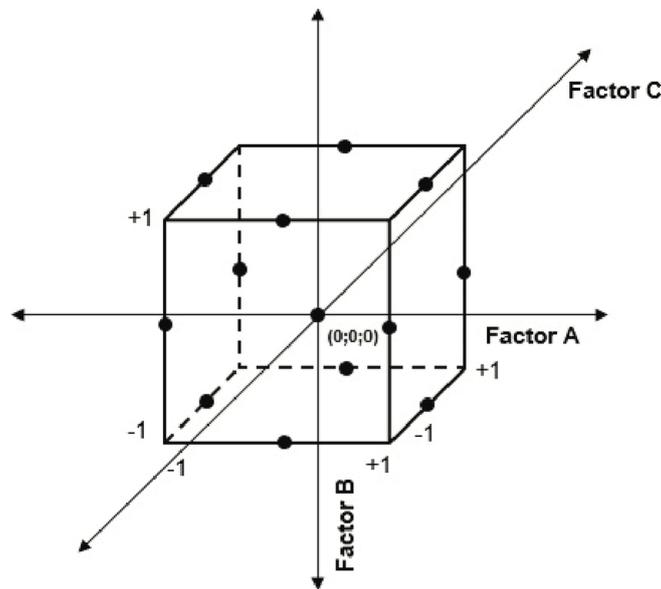


Figura 7. Diseño experimental Box-Behnken para el estudio de tres variables en tres niveles [26].

Box y Behnken sugirieron una manera de seleccionar puntos de un factorial de tres niveles, de modo que estos permitieran estimar los coeficientes de primer y segundo orden del modelo matemático de una manera más eficiente que el correspondiente diseño factorial, sobre todo cuando hay un número elevado de variables (Figura 8) [26].

x_1	x_2	x_3
-1	-1	0
1	-1	0
-1	1	0
1	1	0
-1	0	-1
1	0	-1
-1	0	1
1	0	1
0	-1	-1
0	1	-1
0	-1	1
0	1	1
0	0	0

Figura 8. Matriz experimental del diseño Box-Behnken para el estudio de tres variables en tres niveles [26].

En industria alimentaria, el diseño experimental Box-Behnken es ampliamente utilizado para optimizar diferentes métodos, y entre ellos, los diferentes tipos de extracciones [27].

Ordóñez-Santos et al. (2015) emplearon esta metodología de superficie de respuesta para investigar el efecto que tenían tres variables en el proceso de extracción de carotenoides de *Bactris gasipaes* por ultrasonidos. Las variables que optimizaron con el diseño Box-Behnken fueron la temperatura, el tiempo de extracción y la intensidad de los ultrasonidos [23].

Por otra parte, Tsiaka et al (2018) utilizaron esta metodología también para la extracción de carotenoides, en concreto luteína y zeaxantina, de yema de huevo. La extracción fue realizada tanto por ultrasonidos como por extracción con microondas y las variables que se optimizaron fueron: el solvente empleado para la extracción, la temperatura, el tiempo, la intensidad bien de las microondas o bien de los ultrasonidos, y el ratio solvente/material [24].

3. METODOLOGÍA

3.1. Síntesis del sustitutivo de grasa

Para la preparación de los geles del sustitutivo de grasa se emplean las siguientes sustancias:

- Carragenato: analizado en concentraciones desde el 0,5% hasta el 5% (p/p). La marca comercial es Prosella (Figura 9).
- Aceite refinado de girasol: del 0% al 37% (p/p) del total del sustitutivo. Se emplea el aceite de girasol marca Alimerka.
- Manteca de cerdo: del 0% al 37% (p/p) del total del sustitutivo. La marca comercial utilizada en este caso es Campofrío.
- Agua destilada: el % restante hasta completar al 100%.

Hay que tener en cuenta que la cantidad de aceite vegetal y de grasa animal añadidas no son independientes, sino que la suma de ambas va a constituir siempre el 37% del sustitutivo final. Para ello, dentro de ese 37%, se realizan diferentes combinaciones, que van desde el 100% de aceite o grasa animal hasta el 0%, en intervalos del 25%. Así, por ejemplo, cuando el 75% de la fracción del sustitutivo destinada a estas sustancias sea aceite de girasol, el 25% restante será manteca de cerdo.



Figura 9. Carragenato empleado para la realización de los geles del sustitutivo de grasa (marca Prosella).

En primer lugar, se pesan las cantidades correspondientes de cada uno de los componentes, y a continuación se emplea un homogeneizador para mezclarlas y que se

pueda formar adecuadamente el gel. El homogeneizador (Silent Crusher, Rose Scientific, Canadá), se programa a 12000 rpm y se utiliza el rotor 18 G.

Una vez realizada la mezcla de las sustancias se almacenan las muestras a 5 °C, donde pasadas 24h ya se habrán formado los geles del sustitutivo de grasa.

Además, para determinar el comportamiento de los geles preparados cuando estos son sometidos a un tratamiento térmico a 90 °C, los sustitutivos de grasa se introdujeron en un baño de agua a esta temperatura de modo que se simula un proceso de cocción habitual.

3.2. Texturometría

La fuerza de los geles sintetizados se analiza mediante un texturómetro (TA-XT2, Stable Micro Systems). Se emplea una sonda cilíndrica de aluminio (P20) (Figura 10), y se programa para que la sonda penetre en las muestras 5 mm, lo que supone un 25% de la altura de los geles.

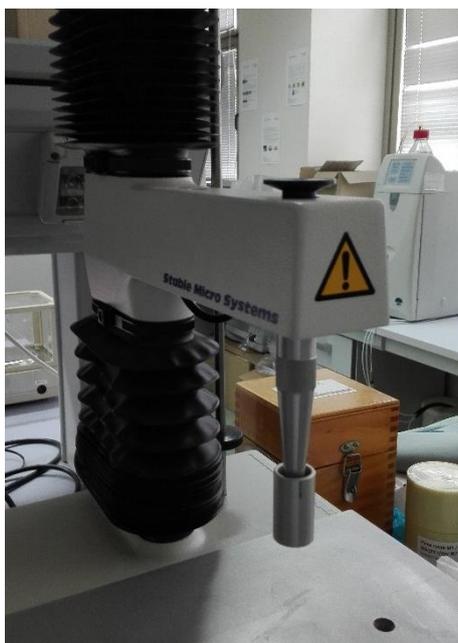


Figura 10. Sonda cilíndrica P20 utilizada para analizar en el texturómetro los geles.

El análisis por texturometría se realiza en las muestras antes y después de someterlas a un tratamiento térmico a 90 °C.

3.3. Pérdida de masa

Durante la noche las muestras permanecen en la nevera para que tenga lugar la formación del gel, y en algunos casos, si bien el gel se forma adecuadamente, aparece un pequeño

exudado a su alrededor. La medición de estos exudados se realiza pesándolos en una balanza.

Por otra parte, para determinar si el contenido de los exudados es únicamente agua o hay otras sustancias pertenecientes al gel, estos se introducen en una estufa a 105 °C durante 24h. Si el contenido de los exudados es agua, esta se evaporará, mientras que si hay aceite u otras sustancias, estas permanecerán en el recipiente una vez pasadas las 24h.

Al igual que en el caso de la texturometría, este procedimiento debe realizarse antes y después de someter a las muestras al baño a 90°C, ya que con la temperatura los geles vuelven a presentar exudados y la composición de los mismos podría variar.

3.4. Separación de las fracciones de la yema de huevo

Para obtener por separado las fracciones de la yema de huevo, en primer lugar se separó la clara de la yema, y esta se secó cuidadosamente con papel. La membrana vitelina se rompió empleando pinzas, y la yema líquida se mezcló con agua en una proporción 1:1,5 (v/v).

A continuación, se ajustó el pH de esta solución de yema de huevo diluida a 7,0 con NaOH 0,1M, y se centrifugó a 10000 g durante 45 minutos.

Tanto el sedimento, es decir los gránulos, como el sobrenadante, es decir el plasma, se recogieron y se sometieron a un proceso de liofilización.

3.5. Extracción de carotenoides

Para determinar en qué condiciones se obtiene una mejor extracción de los carotenoides tanto de la yema de huevo completa como de sus fracciones (plasma y gránulos), se realizan una serie de experimentos en diferentes condiciones y se cuantifica la extracción obtenida mediante un espectrofotómetro (Figura 11), midiendo a la longitud de onda de 450 nm [28].



Figura 11. Espectrofotómetro empleado para cuantificar la cantidad de carotenoides presentes en las muestras.

Las variables de las que se quiere determinar la influencia que ejercen en el proceso son las siguientes:

- Tiempo: se toman muestras del proceso de extracción a los 5, 15, y 25 minutos.
- Temperatura: se establece en un baño. Mediante el empleo de un vaso con entrada y salida para el agua en su parte exterior se asegura que la muestra se encuentre a la temperatura deseada para la extracción (Figura 12). Las temperaturas analizadas son 15°C, 27,5°C, y 40°C.
- Velocidad de agitación: se emplea el homogeneizador (Silent Crusher) con el rotor 12 GM (Figura 12). Los valores a los que se estudia la extracción son 5000 rpm, 10000 rpm, y 15000 rpm.

Los rangos de estudio de las variables se determinaron, en el caso del tiempo, porque se vio que la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos en función de si el tiempo máximo eran 25 minutos o un valor superior, no presentaba grandes diferencias. En cuanto a la temperatura, no se pueden analizar valores superiores ya que debido a la termolabilidad de los carotenoides estos pueden verse afectados. Por último, las velocidades de agitación estudiadas vienen marcadas por los valores máximo y mínimo que permite el homogeneizador.



Figura 12. Equipos empleados para establecer las condiciones de la extracción: vaso conectado a baño de temperaturas (izquierda) y homogeneizador Silent Crusher (derecha).

En primer lugar, tanto la yema completa como el plasma y los gránulos deben ser liofilizados y triturados.

A continuación, se pesan 36g de aceite de girasol y se introducen en el vaso que se encuentra conectado con el baño, ya a la temperatura a la que se quiera realizar la extracción.

Una vez el recipiente se encuentra la temperatura deseada, se pesan 4g de la muestra de la que se van a extraer los carotenoides y se añaden al vaso que contiene el aceite.

Cuando la muestra y el aceite entran en contacto, se programa el homogeneizador a la velocidad que corresponda, y se comienza a contar el tiempo, sacándose alícuotas del proceso a los tiempos que se quieren analizar.

De cada alícuota se toman 2 mL, que se centrifugan a 13000 rpm durante 15 minutos. Mientras que el precipitado puede desecharse, en el sobrenadante se van a encontrar los carotenoides, que se cuantifican midiendo su absorbancia a 450nm. El blanco del espectrofotómetro se realiza con el aceite de girasol empleado como fase líquida para la extracción.

Este procedimiento se repite para todas las combinaciones de las variables a estudiar, y es el mismo cuando se realiza la extracción de la yema completa o de sus fracciones.

Para pasar los valores de absorbancia que nos da el espectrofotómetro a valores de concentración se realiza una recta patrón de β -carotenos a partir de una muestra de concentración conocida.

En este caso, se desarrolló una recta patrón de β -carotenos (sigma Aldrich, ref. 222222) en aceite. Las concentraciones utilizadas fueron 7,5 $\mu\text{g/mL}$, 3,75 $\mu\text{g/mL}$, 1,88 $\mu\text{g/mL}$, 0,94 $\mu\text{g/mL}$ y 0,47 $\mu\text{g/mL}$, y se determinó su absorbancia midiendo a una longitud de onda de 450nm.

3.6. Diseño experimental

El proceso de extracción de carotenoides se modelizó empleando el software Minitab 17 (Minitab Inc, Pennsylvania, USA).

Se realiza un diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken para describir el efecto que la temperatura, el tiempo, y la velocidad de giro ejercen en el proceso de extracción, siendo la variable respuesta la concentración de β -carotenos equivalentes obtenida para cada experimento.

De acuerdo al diseño Box-Behnken, cada variable independiente se estudia en tres niveles, y la ecuación de segundo grado que emplea este modelo es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Siendo Y la variable respuesta, X_i y X_j las variables independientes, y β_i , β_{ii} , y β_{ij} los coeficientes lineal, cuadrático y de interacciones respectivamente.

3.7. Proteínas

Para determinar la concentración de proteínas que había en los gránulos antes y después de la extracción se tomaron dos muestras, una muestra control, que no se sometió al proceso de extracción de carotenoides, y una muestra a la que si se le realizó este proceso. Ambas muestras se centrifugaron a 10000 g durante 25 minutos para coger el precipitado, a continuación, se realizaron lavados con agua, y se introdujeron las muestras en la estufa. Una vez las muestras estaban secas, la cuantificación de las proteínas se llevó a cabo usando el método de combustión de Dumas [29].

Para este propósito se utiliza un CNHS/O Elementar Vario El Analyzer (Elementar, Alemania). El factor de conversión empleado fue de 6,25.

3.8. Determinación de propiedades antioxidantes

Para determinar la capacidad antioxidante in vitro de los aceites enriquecidos con carotenoides se llevó a cabo un ensayo espectrofotométrico utilizando 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), molécula que quedará reducida al estar en contacto con los agentes antioxidantes de la muestra, cambiando su color [30].

En este caso se empleó como control aceite de girasol sin β -carotenos, se coge una muestra con una concentración elevada de estos carotenoides y se somete a ambas al siguiente procedimiento: en primer lugar, se prepara una disolución 1 mM de DPPH, de la que se adicionan 0,3 mL a cada tubo de ensayo (uno para el control y otro para la muestra con β -carotenos). A continuación, se añaden en cada tubo 40 μ L de la muestra correspondiente, y 2,4 mL de etanol. Se mezcla bien en un vortex y se dejan reposar las muestras 30 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, se mide la absorbancia a 517 nm, empleando como blanco etanol.

La diferencia entre las absorbancias del control y de la muestra con β -carotenos va a determinar la capacidad antioxidante que presenta a mayores la muestra procedente de la extracción debido a la presencia de carotenoides.

3.9. Medición del color

Para medir el color de las muestras resultantes de la introducción del aceite con carotenoides en los sustitutivos de grasa se empleó el colorímetro Lovibond (Figura 13), y se obtuvieron los parámetros L^* , a^* , y b^* de acuerdo con la escala CIELAB, siendo la L^* la luminosidad, la a^* las coordenadas rojo/verde y la b^* las coordenadas amarillo/azul.



Figura 13. Colorímetro Lovibond utilizado para medir los diferentes parámetros del color de los sustitutos de grasa.

Utilizando como blanco un gel en el que se introduce aceite de girasol sin carotenoides de la yema de huevo, mediante las diferencias en los parámetros que determina el colorímetro, se compararon los geles resultantes de la introducción del aceite con el que se realiza la extracción de carotenoides de yema completa, plasma y gránulos.

Además, en otras tres muestras se diluye el aceite procedente de cada una de estas extracciones a la mitad, de modo que se pueden ver las diferencias que aparecen en el color en función de la cantidad de aceite con carotenoides añadido.

4. RESULTADOS

En este estudio se utilizó un producto específicamente diseñado para desarrollar sustitutos de grasa animal compuesto esencialmente por carragenato, y dado que se va a realizar la extracción de carotenoides en aceite vegetal (aceite de girasol), en primer lugar, se procedió a analizar el efecto de dicho aceite, sin que aún se haya producido la extracción de los carotenoides, y en combinación con grasa de origen animal, sobre la textura de los geles producidos.

4.1. Ensayos previos del sustitutivo de grasa

- Efecto de la cantidad de carragenato en la fuerza del gel

Para determinar cómo afecta la concentración de carragenato a las propiedades texturales de los geles se realizaron por duplicado 10 muestras con diferente porcentaje de carragenato y se midió la fuerza de los geles resultantes por texturometría (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la cantidad de carragenato en la fuerza de los geles.

Carragenato (%)	Fuerza media del gel (g)
0,5	-
1	-
1,5	106,83 ± 12,24
2	133,77 ± 4,08
2,5	374,80 ± 24,53
3	630,50 ± 18,71
3,5	637,98 ± 17,74
4	723,43 ± 52,31
4,5	759,21 ± 55,38
5	1024,85 ± 46,06

Para las muestras de 0,5% y 1% de carragenato no se pudo realizar la texturometría debido a una incorrecta formación del gel. La poca cantidad de agente gelificante añadida provoca que el gel no se llegue a formar adecuadamente y la muestra queda sin consistencia, como un fluido, por lo que no puede ser analizada correctamente (Figura 14).



Figura 14. Comparación de la consistencia de las muestras con un 1% de carragenato (izquierda) y un 3% de carragenato (derecha).

Tal y como se puede ver en la Tabla 1, a medida que aumenta la cantidad de carragenato la fuerza del gel aumenta, es decir, es necesario aplicar una fuerza mayor para conseguir que la sonda del texturómetro penetre los 5 mm establecidos de acuerdo a como se ha descrito en la sección de materiales y métodos.

Teniendo en cuenta esto, a priori, y tal y como se esperaba, los geles con más cantidad de carragenato serán más duros, y por lo tanto más interesantes a la hora de realizar un sustitutivo de grasa con consistencia.

Estos resultados se ven respaldados por el estudio realizado por Nayak et al. (2016), en el que comprobó que, en su caso, a mayor cantidad de carragenato añadido mayor era la estabilidad de las emulsiones [4].

- Efecto de la temperatura en la fuerza del gel

Cuando se sometieron las muestras con diferentes concentraciones de carragenato a un baño a 50 °C (Tabla 2), se observó que no había fluidificación, es decir, los geles se mantenían, pero aparecía un exudado. Esta pérdida de masa al someter a las muestras a temperaturas elevadas estaría provocada por la pérdida de agua de los geles, pero supone un factor a considerar a la hora de realizar los ensayos definitivos.

Tabla 2. Efecto de la temperatura (50 °C) en la fuerza de los geles con concentraciones de carragenato desde el 1,5% al 5%.

% Carragenato	Fuerza media del gel (g)
1,5	85,63 ± 8,73
2	111,36 ± 2,53
2,5	282,65 ± 20,26
3	407,74 ± 7,55
3,5	395,24 ± 6,93
4	425,86 ± 17,17
4,5	478,07 ± 36,52
5	677,85 ± 49,89

En la siguiente gráfica (Figura 15) se puede ver la comparación de los valores medios de fuerza del gel de las muestras a temperatura de refrigeración (5 °C) y después del baño (50 °C).

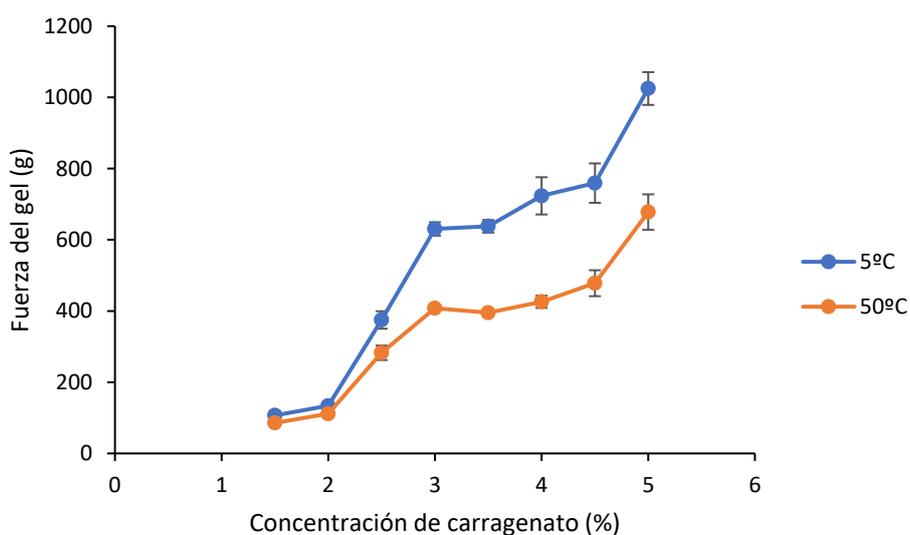


Figura 15. Comparación de la fuerza de los geles antes y después del baño (5 °C y 50 °C).

Para todas las concentraciones de carragenato, al someter los geles al baño a 50 °C la fuerza de los mismos disminuye. De manera global, la fuerza media de todos los geles pasa de ser de 548,921 g con las muestras a 5 °C a ser de 358,05 g cuando se realiza la texturometría a 50 °C. Esto supone una pérdida media del 34,77% en la fuerza de los geles tras el baño a 50 °C.

Además, se puede ver en la gráfica como la disminución en la fuerza de los geles con la temperatura es mayor en las muestras que tienen mayores concentraciones de carragenato.

Una vez conocido el comportamiento de los geles a 50 °C se volvieron a preparar las muestras con concentraciones de carragenato desde el 1,5% al 5%, pero esta vez además se midió el exudado después de que los geles recién preparados pasaran una noche en la nevera a 5 °C, y también después de someterlos a un tratamiento térmico a 90 °C durante 20 minutos. Además, se evaporó dicho exudado para verificar si era sólo agua o tenía algún componente sólido propio de los geles. Por otro lado, y tal y como se hizo a 50 °C, se comprobó la fuerza del gel formado a cada concentración de carragenato antes y después del tratamiento térmico (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto en la dureza de los geles y en la pérdida de masa de la temperatura (90 °C).

% Carragenato	Fuerza del gel 5°C (g)	Fuerza del gel 90°C (g)	Exudado 5°C (g)	Exudado 90°C (g)
1,5	106,05	78,63	4,00	11,89
2	429,22	229,64	ND	3,89
2,5	666,38	486,98	6,15	2,35
3	552,94	468,20	4,84	3,02
3,5	796,12	656,71	3,87	2,73
4	1008,14	809,20	3,50	2,49
4,5	991,78	755,57	3,51	2,05
5	1172,73	894,98	3,33	2,08

Al igual que ocurría a 50 °C, al someter a las muestras a un baño a 90 °C, la fuerza de todos los geles disminuye (Tabla 3). En este caso, la pérdida media de fuerza del gel con la temperatura es del 24,92%.

En cuanto a la pérdida de masa, si bien antes de someter a las muestras a los 90 °C no se observa ninguna tendencia en la magnitud de las pérdidas, después del baño se puede ver como a medida que aumenta la cantidad de carragenato las pérdidas van disminuyendo. Esto podría estar provocado por una mayor consistencia del gel debida a la mayor cantidad de agente gelificante, y en consecuencia, una mayor resistencia del mismo a las elevadas temperaturas. En promedio, la pérdida de masa es ligeramente superior después de someter a las muestras a los 90 °C, siendo las pérdidas antes del baño del 3,68%, y después del baño del 3,81%.

Cabe señalar que el exudado de 11,89 g que presenta la muestra con un 1,5% de carragenato tras someterla a los 90 °C puede ser debido a la poca cantidad de agente gelificante añadido, que provocaría que el gel no resista la temperatura y se pierde una cantidad elevada de masa en el proceso.

Por último y en cuanto a la composición del exudado, se constató que en todos los casos la masa perdida es agua, que se evapora dejando una fina película de carragenato en el fondo (Figura 16). Este remanente de carragenato no dio medida en una balanza con dos decimales, por lo que se puede considerar que la pérdida de carragenato durante la cocción es marginal.

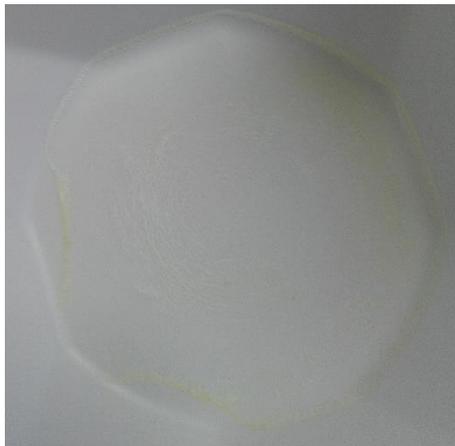


Figura 16. Resto de carragenato resultante después de la evaporación del exudado de la muestra preparada con un 3% de carragenato.

- Efecto de la composición en la fuerza del gel

Este tipo de sustitutivos de grasa animal se pueden preparar añadiendo una parte de aceite vegetal además de agua con el objetivo de incrementar su calidad nutricional, debido a que estos aceites carecen de colesterol y tienen un ratio elevado de ácidos grasos insaturados [31]. Sin embargo, la eliminación total de la grasa animal en el sustitutivo puede provocar cambios en la textura y sabor del producto final percibido por el consumidor, provocando rechazo. De esta manera, y con el fin de determinar cómo afectan el aceite vegetal y la grasa animal a la texturometría y a la pérdida de masa de los geles, se analizaron por duplicado tres preparaciones diferentes de los geles de carragenato usando diferentes proporciones de aceite y grasa: 100% de aceite, 100% de grasa, y una mezcla 50% - 50% de ambas (Tabla 4).

La concentración de carragenato empleada para realizar estas muestras fue del 2,5%. Se seleccionó esta concentración ya que permite obtener niveles bastante elevados de fuerza en los geles, sin generar un excesivo consumo de carragenato.

Tabla 4. Efecto de la composición en la fuerza y en la pérdida de masa de los geles.

Composición (%)	Fuerza media del gel 5 °C (g)	Fuerza media del gel 90 °C (g)	Exudado 5 °C (g)	Exudado 90 °C (g)
100% Aceite	634,35 ± 11,40	589,28 ± 89,86	1,30 ± 0,01	1,78 ± 0,31
50% Aceite - 50% Grasa	423,09 ± 20,40	312,06 ± 111,86	0,00 ± 0,00	0,47
100% Grasa	1141,99 ± 130,84	428,23 ± 133,69	0,00 ± 0,00	1,22 ± 0,29

En relación a la pérdida de masa, se observa que después de pasar toda la noche en cámara a 5 °C, únicamente la muestra con un 100% de aceite presenta exudado, mientras que en las dos muestras que contienen grasa animal, en mayor o menor medida, los geles se mantuvieron intactos. Sin embargo, una vez las muestras fueron sometidas a tratamiento térmico a 90°C durante 20 minutos, en las tres muestras aparece exudado, siendo en este caso el de la muestra con un 100% de aceite también el que mayor exudado tiene.

El hecho de que en la muestra con un 100% de aceite vegetal aparezca exudado a 5 °C mientras que en las muestras que contienen grasa animal no, puede ser debido a que la manteca de cerdo a temperatura de refrigeración presenta una mayor consistencia, por lo que los geles que la contienen no sufrirían pérdida de masa. Sin embargo, cuando esta grasa animal se somete a un tratamiento térmico se funde, por lo que los geles pierden consistencia y pasan a tener pérdida de masa al igual que la muestra de aceite.

Además, se ha observado que en los geles preparados con aceite vegetal, grasa animal, o una mezcla de ambos, la cantidad que hay de cada uno de estos dos componentes afecta a las propiedades texturales del gel resultante. Para las tres muestras se observa que, al igual que en los experimentos anteriores, al someter a los geles a un baño a 90 °C la fuerza de los mismos disminuye, sin embargo, cabe señalar que esta disminución es mucho mayor para las muestras con un 100% de grasa, que son las que presentan un valor mayor de fuerza al principio, pero que se ven muy afectadas por la temperatura.

Detrás de las muestras con un 100% de grasa, las muestras con un 100% de aceite son las segundas en cuanto a fuerza de los geles después de pasar la noche a 5 °C, y además, estas muestras no parecen verse muy afectadas por el tratamiento térmico, siendo su disminución en la fuerza del gel la más pequeña. El hecho de que estos geles resistan bien la temperatura de cocción resulta muy interesante a la hora de seleccionar un sustitutivo de grasa, ya que permite que los alimentos en los que se vayan a introducir mantengan las propiedades deseadas después de sufrir procesos de cocinado.

Para finalizar, señalar que las mezclas 50% de aceite - 50% de grasa resultan, a priori, la peor opción, al presentar valores bajos en la fuerza del gel tanto antes como después del baño. Estos resultados muestran que la combinación de ambas sustancias presenta unas propiedades texturales peores que las obtenidas por separado, por lo que no interesaría mezclarlas.

Si bien para la mayoría de alimentos lo que se busca en un sustitutivo de grasa es que el gel tenga consistencia y que soporte el tratamiento térmico que simula el cocinado adecuadamente, esto no tienen por qué ser así en todos los casos. Por ejemplo, a la hora de introducir el sustitutivo de grasa en galletas, cuanto mayor dureza tenga el gel mejor [2]. Pero a la hora de introducir el sustitutivo en un alimento que no requiera estas características como la morcilla de León, de textura menos firme, un gel con una fuerza menor sería la opción más lógica. En este estudio, dado que la mayoría de alimentos en los que potencialmente se va a introducir un sustitutivo de grasa son de consistencia sólida, se van a seleccionar los geles con una dureza mayor como característica deseada.

4.2. Caracterización del sustitutivo de grasa

Una vez se conoce que la concentración de carragenato, la temperatura, y la composición de los geles van a afectar a las propiedades del sustitutivo, se realizó por duplicado el ensayo en el que se incluyeron todos estos factores de manera integral. Las concentraciones de carragenato que se ensayaron fueron 2%, 3,5% y 5% debido a que, con concentraciones inferiores al 2%, no había cantidad suficiente de agente gelificante y los geles no se formaban adecuadamente, mientras que para concentraciones superiores al 5% la cantidad de carragenato que hay que adicionar es elevada e innecesaria, ya que se pueden realizar satisfactoriamente los sustitutivos de grasa con las concentraciones estudiadas.

Las medias de los resultados obtenidos para la pérdida de masa se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la composición en la pérdida de masa de los geles.

[Carragenato] (%)	Grasa animal (g)	Aceite de girasol (g)	Exudado 5 °C (g)	Exudado 90 °C (g)
2	18,50	0,00	-	-
2	13,90	4,63	0,00 ± 0,00	12,24 ± 1,44
2	9,30	9,30	0,00 ± 0,00	14,00 ± 0,65
2	4,63	13,90	0,00 ± 0,00	0,83 ± 0,38
2	0,00	18,50	0,89 ± 0,13	1,84 ± 0,74
3,5	18,50	0,00	0,00 ± 0,00	3,84 ± 1,68
3,5	13,90	4,63	0,00 ± 0,00	5,19 ± 4,07
3,5	9,30	9,30	0,00 ± 0,00	3,02 ± 2,66
3,5	4,63	13,90	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,61
3,5	0,00	18,50	0,28 ± 0,04	0,44 ± 0,02
5	18,50	0,00	0,00 ± 0,00	2,24 ± 1,86
5	13,90	4,63	0,00 ± 0,00	4,92 ± 3,62
5	9,30	9,30	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,13
5	4,63	13,90	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,10
5	0,00	18,50	0,20 ± 0,13	0,25 ± 0,03

En primer lugar, señalar que en la muestra realizada con una concentración de carragenato del 2%, con 18,5 g de grasa animal, y sin añadir aceite vegetal, no hubo una correcta formación del gel, y por lo tanto no se pudo analizar. La baja concentración de carragenato es el motivo por el cual la muestra no gelificó adecuadamente y quedó con un aspecto grumoso. Sin embargo, en el resto de muestras con esta concentración de carragenato sí se pudo formar el gel, ya que la concentración de grasa que tenían era menor, y a mayor cantidad de grasa más agente gelificante es necesario.

En cuanto a los exudados de las muestras a 5 °C, se observa como únicamente las muestras con un 100% de aceite presentan exudado antes del baño, y que la magnitud de los mismos va disminuyendo a medida que se aumenta la concentración de carragenato (Tabla 5). Una vez introducidos los exudados en la estufa se aprecia como la masa que habían

perdido los geles se evapora, y por lo tanto la composición de los mismos era agua, si bien queda al fondo un resto amarillento de carragenato indetectable en una balanza con dos decimales, como ya ocurría en los ensayos previos.

En relación a los exudados de las muestras tras el baño a 90 °C se puede ver como en este caso todas las muestras presentan exudado en mayor o menor medida, y que estos son mayores que los que había antes de someter las muestras a elevada temperatura, por lo que el baño provoca pérdida de masa en los geles (Tabla 5).

Tal y como ocurría a 5 °C, a medida que aumenta la concentración de carragenato los exudados a 90 °C disminuyen, y además, se observa que las muestras con un mayor contenido de aceite vegetal y menos grasa animal presentan menores cantidades de exudado tras el baño (Tabla 5). La menor cantidad de exudado cuanto mayor es la cantidad de agente gelificante añadida se explica por la mejor formación del gel en estos casos, que no solo implica una mayor fuerza en el gel, sino que también provoca que este, al tener una mayor consistencia, resista mejor el tratamiento térmico. En cuanto a las pérdidas en función de la composición de aceite vegetal/grasa animal, el hecho de que las muestras con un contenido mayor de aceite de girasol tengan exudados menores puede ser debido a que en estos casos los geles se formen más adecuadamente, o bien, como ya se mencionó en los ensayos previos, a que la grasa cuando es sometida a tratamientos térmicos se funde, modificándose considerablemente sus propiedades, mientras que el aceite no se ven tan afectado por estos tipo de tratamientos.

Al introducir los exudados de las muestras tras el baño en la estufa para ver su composición se observa que, para las muestras con un 2% de carragenato y elevada cantidad de grasa animal, una parte del exudado no se evapora, y por lo tanto es el aceite que se introdujo en el gel y que debido a una mala formación del mismo se ha perdido al someter la muestra a la temperatura. Esto mismo ocurre con las muestras con un contenido alto de grasa animal pero con un 3,5% y un 5% de carragenato, en las que también se observan restos de aceite en el exudado, aunque estos son menores cuanto más cantidad de carragenato. A diferencia de esto, en las muestras con una mayor cantidad de aceite vegetal, el contenido de los exudados es agua que se evapora en la estufa, dejando únicamente una fina película residual en el fondo. El exudado de aceite por parte de las muestras con una cantidad elevada de grasa animal puede ser debido, como ya se ha dicho, al efecto que los tratamientos térmicos ejercen en la grasa.

Teniendo en cuenta todo esto, se puede concluir que para obtener un gel en el que la pérdida de masa sea mínima hay que trabajar preferiblemente con un 5% de carragenato y compuesto o totalmente o en su mayoría por aceite vegetal.

Por otra parte, al igual que ocurría en los ensayos previos, en el análisis por texturometría (Figuras 17 y 18) se observa como al someter a las muestras al baño a 90 °C, la fuerza de los geles disminuye. Esta pérdida de fuerza en los geles afecta en un grado mayor a las muestras con un 100% de grasa animal, siendo la pérdida media en este caso del 66 %. En el otro extremo, las muestras con un 100% de aceite vegetal son las que menos se ven afectadas por el baño, siendo su pérdida media de fuerza con el baño casi nula.

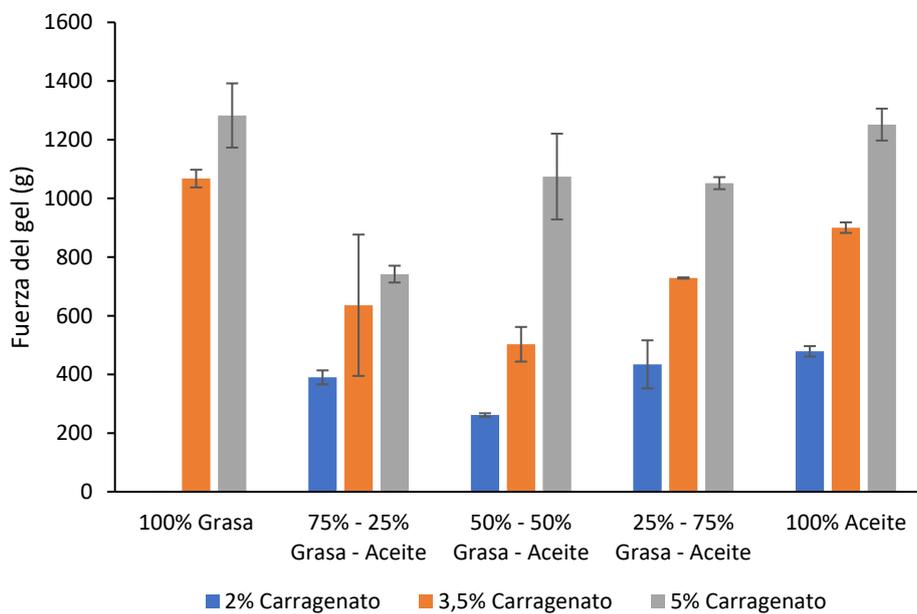


Figura 17. Efecto de la composición en la fuerza del gel a 5°C.

Además, tal y como se puede ver en la Figura 17, sea cual sea la composición de grasa animal/aceite vegetal, a mayor cantidad de carragenato, mayor es la fuerza del gel.

Analizando dentro de cada concentración de carragenato, se observa que, para los tres niveles analizados, las muestras con el 100% de grasa animal y las de 100% de aceite vegetal son las que mayor fuerza presentan en sus geles, y que esta fuerza va disminuyendo a medida que se mezclan estas dos sustancias (Figura 17).

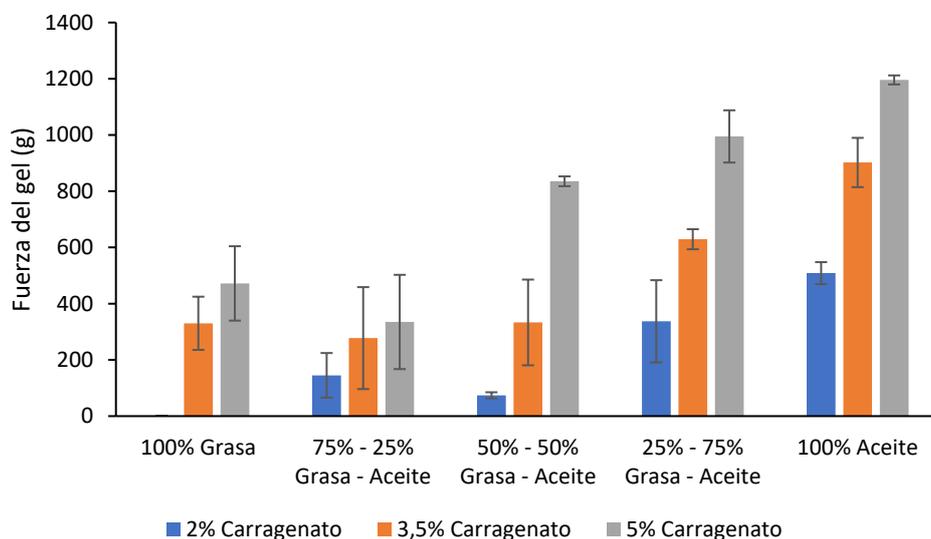


Figura 18. Efecto de la composición en la fuerza del gel a 90 °C.

Tras someter las muestras al baño a 90°C, se mantiene que, para cada concentración de grasa animal y aceite vegetal, a mayor cantidad de carragenato mayor es la fuerza del gel (Figura 18).

Además, se observa que para todas las concentraciones de carragenato, las muestras con 100% de aceite vegetal son las que mayor valor de fuerza de gel tienen, y que esta fuerza va disminuyendo a medida que las muestras contienen menos aceite vegetal y va aumentando su cantidad de grasa animal, para finalmente elevarse un poco la fuerza en las muestras con 100% de grasa animal (Figura 18).

En resumen, lo que afecta negativamente a las propiedades texturales de los geles es la mezcla de aceite vegetal y grasa animal, siendo mayor la fuerza de las muestras que solo llevan uno de estos componentes. A esto hay que sumarle el hecho de que los geles con un 100% de aceite resisten mejor a la temperatura, manteniéndose su fuerza elevada tras el baño a 90 °C, y que además resultan mucho más sanos para el consumidor.

Teniendo en cuenta los resultados tanto de la pérdida de masa como de la texturometría, se puede concluir que la mejor opción para emplear como sustitutivo de grasa sería un gel con un 5% de carragenato y un 100% de aceite de girasol, ya que de este modo se

consigue que la pérdida de masa no sea elevada, y que la fuerza de los geles sea alta tanto antes como después del tratamiento térmico.

4.3. Extracción de carotenoides

4.3.1. Extracción de carotenoides de yema de huevo

En primer lugar, de los carotenoides que se extraen de la yema de huevo, para poder obtener la concentración de β -carotenos equivalentes que había en las muestras de las diferentes extracciones, se realizó una recta patrón partiendo de una concentración conocida de β -carotenos (Figura 19).

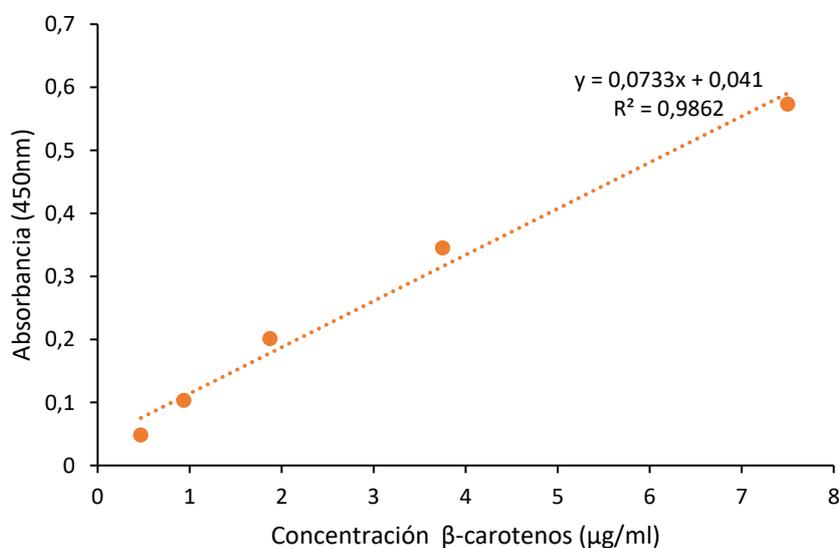


Figura 19. Recta patrón de la absorbanza (450nm) en función de la concentración de β -carotenos ($\mu\text{g/ml}$).

Una vez hallada la ecuación de la recta, los valores de absorbanza obtenidos experimentalmente se pueden convertir en valores de concentración de β -carotenos equivalentes, que son los que se han empleado para modelizar el proceso.

Al realizar la extracción de carotenoides de yema de huevo por duplicado en las diferentes condiciones, tal y como se especificó en la sección de materiales y métodos, los valores obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de la extracción de β -carotenos en las diferentes condiciones.

Temperatura (°C)	Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	Absorbancia media (450 nm)	β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/ml}$)
15	5000	5	$0,406 \pm 0,001$	4,973
		15	$0,429 \pm 0,007$	5,293
		25	$0,471 \pm 0,005$	5,859
	10000	5	$0,436 \pm 0,004$	5,389
		15	$0,456 \pm 0,010$	5,655
		25	$0,474 \pm 0,007$	5,900
	15000	5	$0,440 \pm 0,010$	5,437
		15	$0,478 \pm 0,003$	5,955
		25	$0,483 \pm 0,012$	6,030
27,5	5000	5	$0,412 \pm 0,005$	5,061
		15	$0,452 \pm 0,014$	5,600
		25	$0,485 \pm 0,001$	6,057
	10000	5	$0,404 \pm 0,030$	4,952
		15	$0,473 \pm 0,017$	5,887
		25	$0,501 \pm 0,021$	6,276
	15000	5	$0,462 \pm 0,002$	5,737
		15	$0,489 \pm 0,001$	6,112
		25	$0,500 \pm 0,002$	6,262
40	5000	5	$0,473 \pm 0,019$	5,894
		15	$0,486 \pm 0,011$	6,064
		25	$0,505 \pm 0,003$	6,323
	10000	5	$0,467 \pm 0,007$	5,812
		15	$0,493 \pm 0,013$	6,160
		25	$0,523 \pm 0,009$	6,569
	15000	5	$0,478 \pm 0,000$	5,962
		15	$0,516 \pm 0,022$	6,473
		25	$0,518 \pm 0,017$	6,501

Analizando los valores obtenidos se puede observar como a mayor temperatura, mayores son las absorbancias, y por lo tanto mayor es la cantidad de β -carotenos equivalentes que se consigue extraer en el proceso (Tabla 6). Si nos fijamos en los dos valores extremos de temperatura analizados (15°C y 40°C), y comparamos los resultados obtenidos realizando los experimentos con un tiempo de extracción de 5 minutos, la pérdida de β -carotenos equivalentes cuando se emplean 5000, 10000, y 15000 rpm es del 15,63%, del 7,28%, y del 8,81% respectivamente. Se puede comprobar como el efecto de la temperatura tiene casi el doble de valor cuando el proceso se realiza a baja velocidad, mientras que su efecto a las velocidades de giro intermedia y alta toma valores similares.

Por otra parte, las velocidades que se aplican al proceso también parecen afectar a la cantidad de β -carotenos extraídos, siendo esta mayor a medida que se aumenta la velocidad de giro (Tabla 6). En este caso, cuando comparamos los valores obtenidos a 5000 rpm y 15000 rpm a las diferentes temperaturas y para un tiempo de 15 minutos, las pérdidas observadas son, para 15°C , del 10,16%, para $27,5^{\circ}\text{C}$, del 7,67%, y para 40°C , del 5,82%. La tendencia en este caso es clara, cuanto menor es la temperatura a la que se realiza el proceso, mayor influencia tiene la velocidad de giro en la cantidad de β -carotenos extraídos.

Por último, a medida que aumenta el tiempo del proceso, también se puede ver como aumenta la concentración de β -carotenos equivalentes (Tabla 6). La pérdida de β -carotenos equivalentes cuando la extracción se realiza durante 5 minutos frente a los 25 minutos máximos estudiados, fijando la temperatura a $27,5^{\circ}\text{C}$, es del 15,05% para 5000 rpm, del 19,36% para 10000 rpm, y del 7,70% para 15000 rpm, por lo que en este caso, para los valores intermedios de temperatura y de velocidad de giro es donde se observa un mayor efecto del tiempo en el proceso de extracción.

Aunando todos estos resultados se puede concluir que las tres variables estudiadas afectan al proceso de extracción de β -carotenos equivalentes de yema de huevo, siendo el tiempo la que más efecto tiene, seguido por la temperatura, y por último la velocidad de giro.

Para confirmar estos resultados y obtener una ecuación que permita predecir la salida de cualquier experimento que se realice dentro del intervalo delimitado por los valores estudiados, se modelizó el proceso empleando un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken.

El Box-Behnken confirmó que, con valores de p menores a 0,05, tanto la temperatura como la velocidad y el tiempo tenían un efecto significativo en el proceso, quedando descartados los efectos cuadráticos y de retroalimentación. En inferencia estadística, donde el objetivo es llevar a cabo predicciones con ayuda del modelo, estos coeficientes se eliminarían de la ecuación, ya que hay evidencias estadísticas suficientes para probar que el valor concreto que toman en la muestra poblacional es debido al azar, y no es por el contrario el valor verdadero que permita describir estadísticamente a toda la población. Sin embargo, en el caso de la optimización de variables, se sabe que es recomendable mantener todos los efectos lineales, cuadráticos y bilineales de cada variable [32].

De manera global, el modelo presenta una R^2 de 95,11%, y una R^2 ajustada de 86,31%, por lo que podría considerarse como adecuado.

En cuanto al efecto de cada variable, al igual que se había deducido con el análisis de los datos, la variable con un mayor impacto sobre el proceso de extracción es el tiempo, con un efecto que presentó un valor de 0,6973, seguido por la temperatura, con 0,5953, y por último la velocidad, con 0,4880 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos de yema de huevo.

Modelo	Valor P	Valor F	Coefficientes estimados	Efecto
Temperatura	0,003	29,87	0,2976	0,5953
Velocidad	0,007	20,08	0,2440	0,4880
Tiempo	0,001	40,99	0,3486	0,6973
Temperatura*Temperatura	0,273	1,52	0,0988	0,1975
Velocidad * Velocidad	0,643	0,24	-0,0395	-0,0790
Tiempo*Tiempo	0,433	0,72	-0,0682	-0,1365
Temperatura* Velocidad	0,449	0,67	-0,0633	-0,1265
Temperatura*Tiempo	0,461	0,64	0,0615	0,1230
Velocidad *Tiempo	0,187	2,34	-0,1178	-0,2355
Falta de ajuste	0,944	0,11	-	-

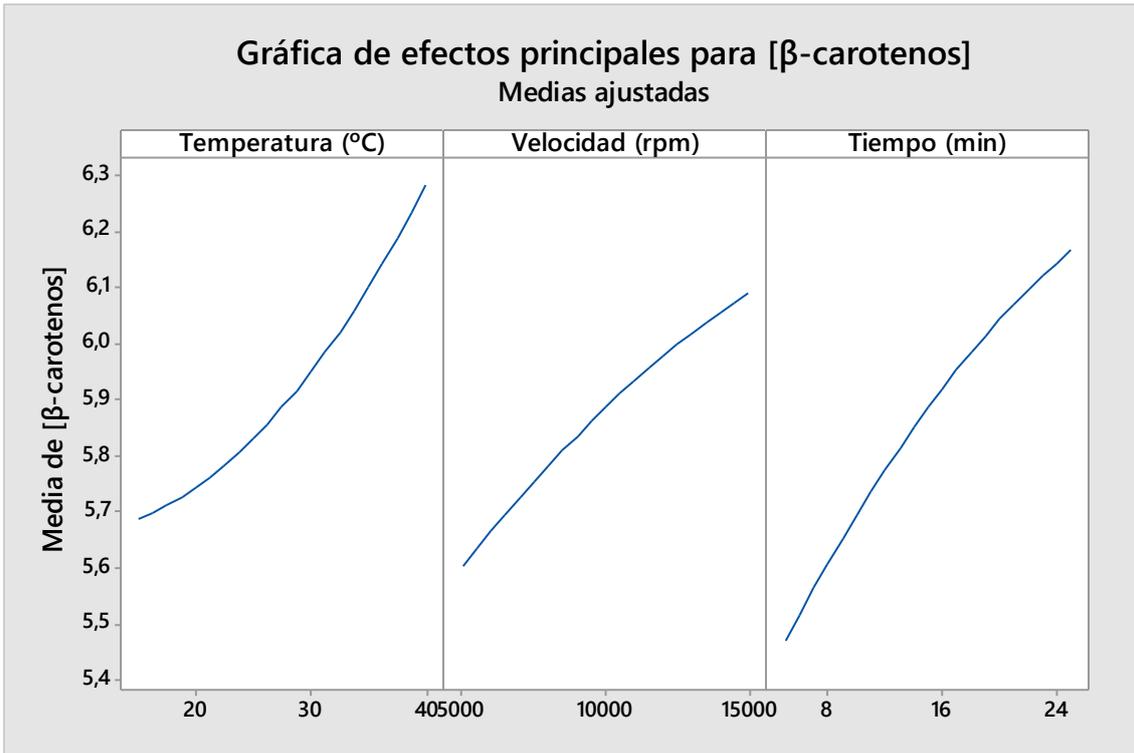
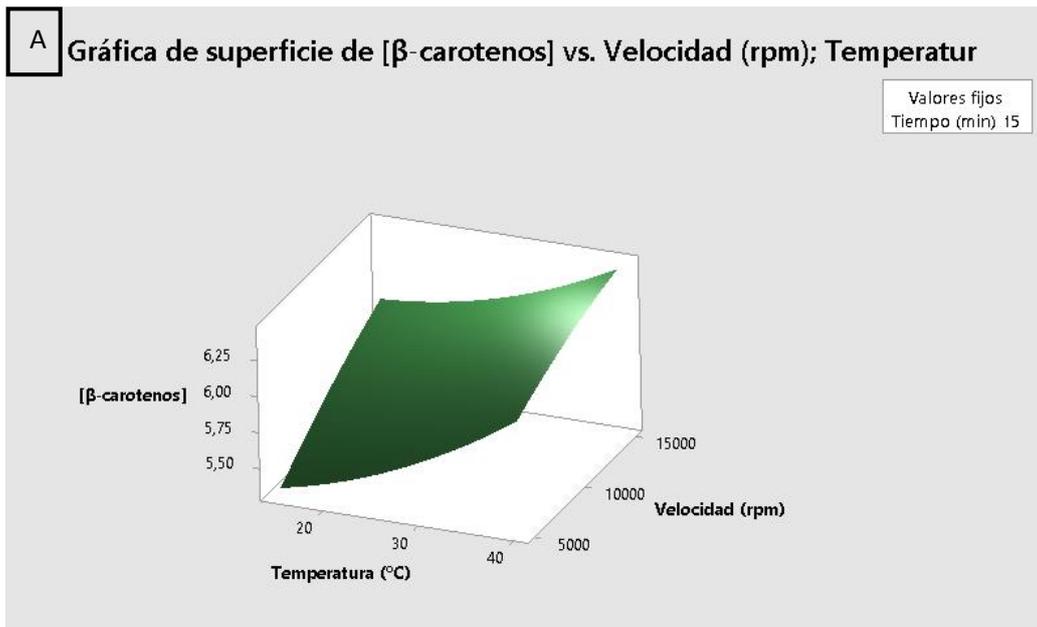


Figura 20. Efecto de la temperatura ($^{\circ}$ C), velocidad de giro (rpm), y tiempo (min) en la extracción de β -carotenos de yema de huevo.

En la Figura 20 se puede ver cómo a medida que aumenta el valor de cada una de las tres variables estudiadas (temperatura, velocidad, y tiempo), la concentración de β -carotenos también aumenta.



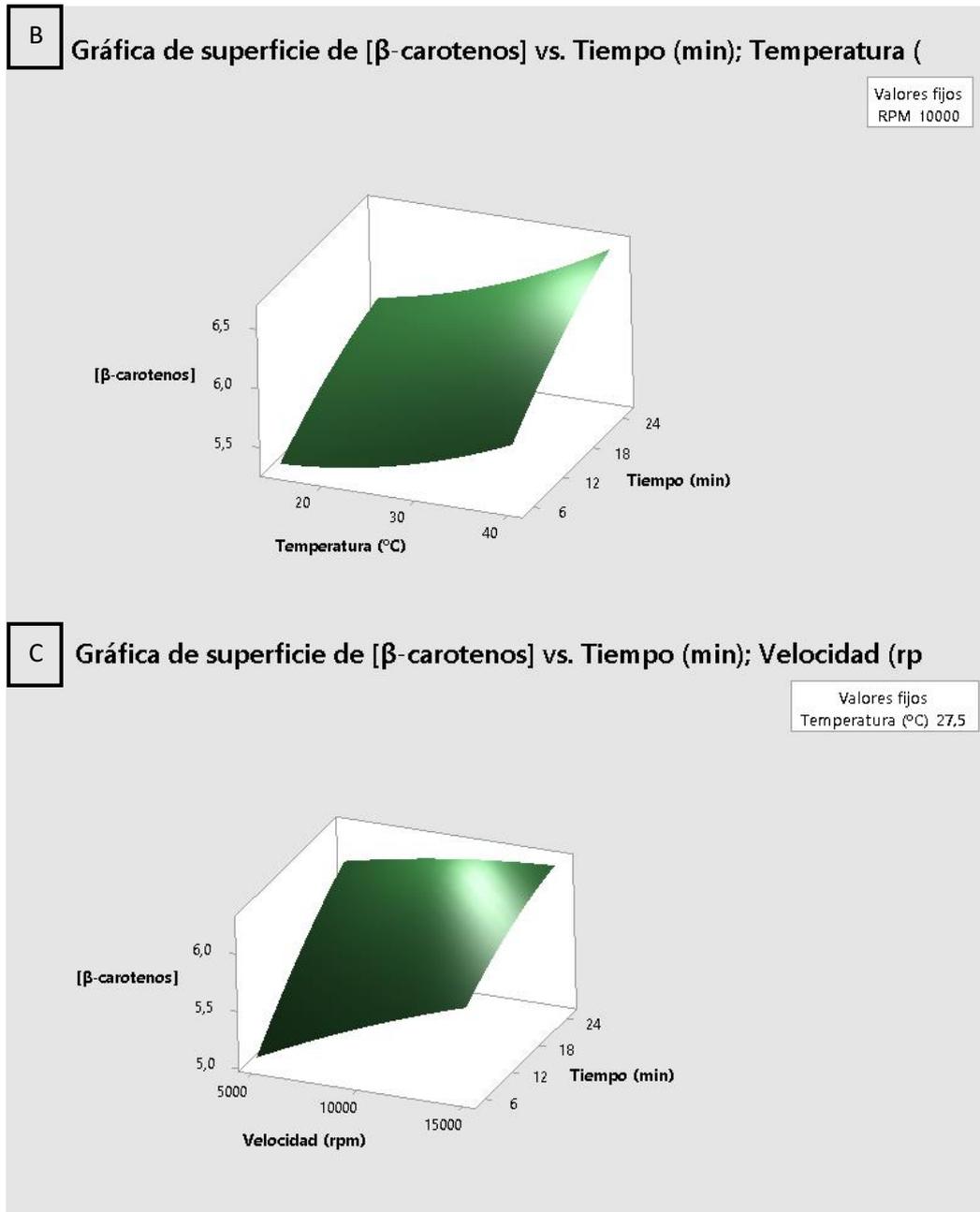


Figura 21. Gráficas de superficie de respuesta de β -carotenos equivalentes frente a: velocidad y temperatura (A), tiempo y temperatura (B), y tiempo y velocidad (C).

En las gráficas de superficie de respuesta obtenidas con el Box-Behnken (Figura 21) se puede apreciar como en todos los casos la tendencia a medida que se avanza en los ejes X y Z es a que el eje Y, es decir, la concentración de β -carotenos, también aumente. El hecho de que en ninguna gráfica se alcance un punto máximo implica que trabajando en las condiciones analizadas no se obtendría la extracción óptima, sino que, dada la tendencia ascendente de las superficies, si se elevaran más los valores de las variables, aumentaría aún más la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos.

De acuerdo a la superficie respuesta que relaciona la temperatura de extracción con el nivel de agitación al que fue sometida la muestra (variable rpm) (Figura 21.A), se puede observar como a la máxima temperatura ensayada el efecto de la velocidad de giro sobre la cantidad de carotenoides equivalentes extraídos fue significativamente menor que a temperaturas más bajas. Además, de acuerdo a la curva de superficie mostrada en la Figura 21.B, a la máxima temperatura ensayada el efecto del tiempo también fue menor que a temperaturas más bajas. Finalmente, analizando la superficie de respuesta que se presenta en la Figura 21.C, se aprecia que el efecto de la velocidad de giro sobre la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos es prácticamente nulo cuando el tiempo de ensayo se extendía hasta los 25 minutos, pero que sin embargo, al menor tiempo de extracción ensayado, el impacto de velocidad resultó mucho más relevante, aumentándose la cantidad de carotenoides extraídos de 5,061 $\mu\text{g/mL}$ a 5,737 $\mu\text{g/mL}$ cuando se pasaba de 5000 a 15000 rpm durante los primeros cinco minutos de extracción a 27,5 °C. De todos estos datos se deduce que cuanto más alta es la temperatura de ensayo menor importancia tiene la energía mecánica aplicada al sistema en forma de agitación, y menor relevancia tiene el tiempo de extracción, pero que sin embargo, y teniendo en cuenta que los carotenoides son en general moléculas sensibles a la temperatura, si se pretende realizar la extracción a las temperaturas medias y más bajas analizadas en este trabajo, no sólo se debería de considerar extender el tiempo de extracción, sino también aplicar los máximos valores de velocidades de agitación ensayados.

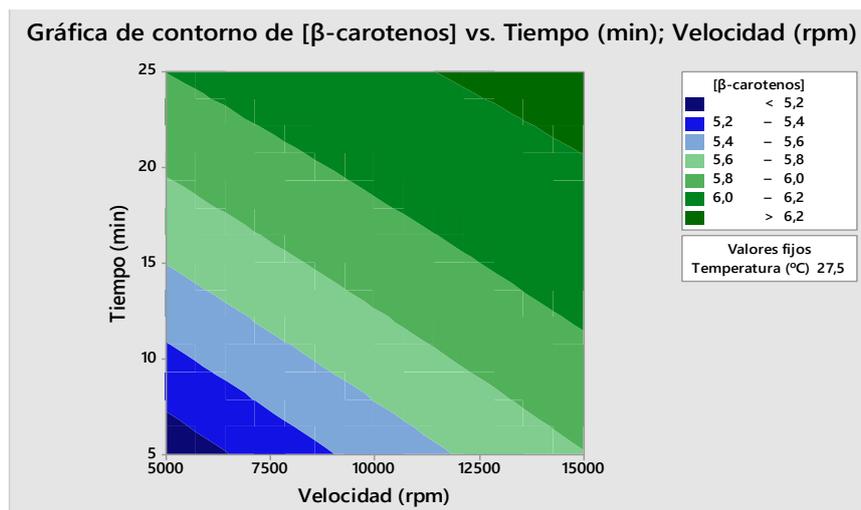


Figura 22. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g}/\text{mL}$) extraídos de yema de huevo. La temperatura se ha fijado a 27,5 °C.

En la gráfica de contornos (Figura 22) se puede ver cómo, para una temperatura de 27,5 °C, los valores elevados de extracción ($> 6,0$) se consiguen en un rango bastante amplio de condiciones, que incluye tanto las máximas rpm y tiempos, como combinaciones de ambos parámetros en las que una de las variables toma el valor máximo estudiado y la otra el intermedio. Sin embargo, los valores máximos de extracción nunca se alcanzan con esta temperatura, por lo que se puede concluir que la temperatura es un parámetro fundamental a la hora de obtener la máxima concentración de β -carotenos equivalentes posible (Figura 22). Por otra parte, las extracciones mínimas a esta temperatura solo aparecen cuando se opera a 5000 rpm y durante 5 minutos, es decir, en ambos casos los valores mínimos de los intervalos estudiados (Figura 22).

Por último, la ecuación de regresión obtenida en unidades no codificadas es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 [\beta - \text{carotenos}] &= 3,959 - 0,0082 * \text{Temperatura} + 0,000144 * \text{rpm} + 0,0654 \\
 &* \text{Tiempo} + 0,000632 * \text{Temperatura} * \text{Temperatura} - 0,000682 \\
 &* \text{Tiempo} * \text{Tiempo} - 0,000001 * \text{Temperatura} * \text{rpm} + 0,000492 \\
 &* \text{Temperatura} * \text{Tiempo} - 0,000002 * \text{rpm} * \text{Tiempo}
 \end{aligned}$$

4.3.2. Extracción de carotenoides del plasma

Al realizar la extracción de carotenoides en las mismas condiciones, pero únicamente con la fracción de plasma de la yema de huevo, los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la tabla adjunta (Tabla 8).

Tabla 8. Extracción de β -carotenos del plasma de la yema de huevo.

Temperatura (°C)	Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	Absorbancia (450nm)	β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/ml}$)
15	5000	5	0,383	4,666
		15	0,457	5,675
		25	0,470	5,853
	10000	5	0,445	5,512
		15	0,480	5,989
		25	0,490	6,126
	15000	5	0,463	5,757
		15	0,488	6,098
		25	0,499	6,248
27,5	5000	5	0,452	5,607
		15	0,472	5,880
		25	0,474	5,907
	10000	5	0,485	6,057
		15	0,493	6,166
		25	0,503	6,303
	15000	5	0,492	6,153
		15	0,502	6,289
		25	0,506	6,344
40	5000	5	0,449	5,566
		15	0,482	6,016
		25	0,486	6,071
	10000	5	0,496	6,207
		15	0,503	6,303
		25	0,517	6,494
	15000	5	0,506	6,344
		15	0,509	6,385
		25	0,513	6,439

De igual manera que trabajando con la yema completa, en el plasma también se observa como a medida que se trabaja a mayor temperatura, mayor tiempo, y mayores rpm, la concentración de β -carotenos equivalentes también aumenta (Figura 23).

En este caso, cuando fijamos el tiempo de extracción en 5 minutos para ver el efecto que tiene trabajar a 15 °C o a 40 °C, se observa que para 5000, 10000, y 15000 rpm las pérdidas son del 16,18%, 11,21% y 9,25% respectivamente. Al igual que ya ocurría al realizar el ensayo con la yema completa, se obtiene que cuanto menor es la velocidad de agitación aplicada al proceso (rpm), mayor es el efecto que la temperatura ejerce en este.

En cuanto a la velocidad de agitación, la diferencia entre aplicar 5000 rpm o 15000 rpm cuando se fija el tiempo de extracción en 5 minutos, es del 18,96% para 15 °C, del 8,867% para 27,5 °C, y del 12,26% para 40 °C, por lo que la mayor influencia de la velocidad de agitación para el plasma se da cuando la temperatura es la mínima analizada (15 °C).

Por último, la pérdida en función de si se realiza la extracción durante 5 minutos o 25 minutos fijando la temperatura a 15 °C es del 20,28% para 5000 rpm, del 10,02% para 10000 rpm, y del 7,86% para 15000 rpm. Como ya ocurría con la temperatura, el mayor efecto del tiempo en el proceso se da cuando la velocidad de agitación es la mínima (5000 rpm).

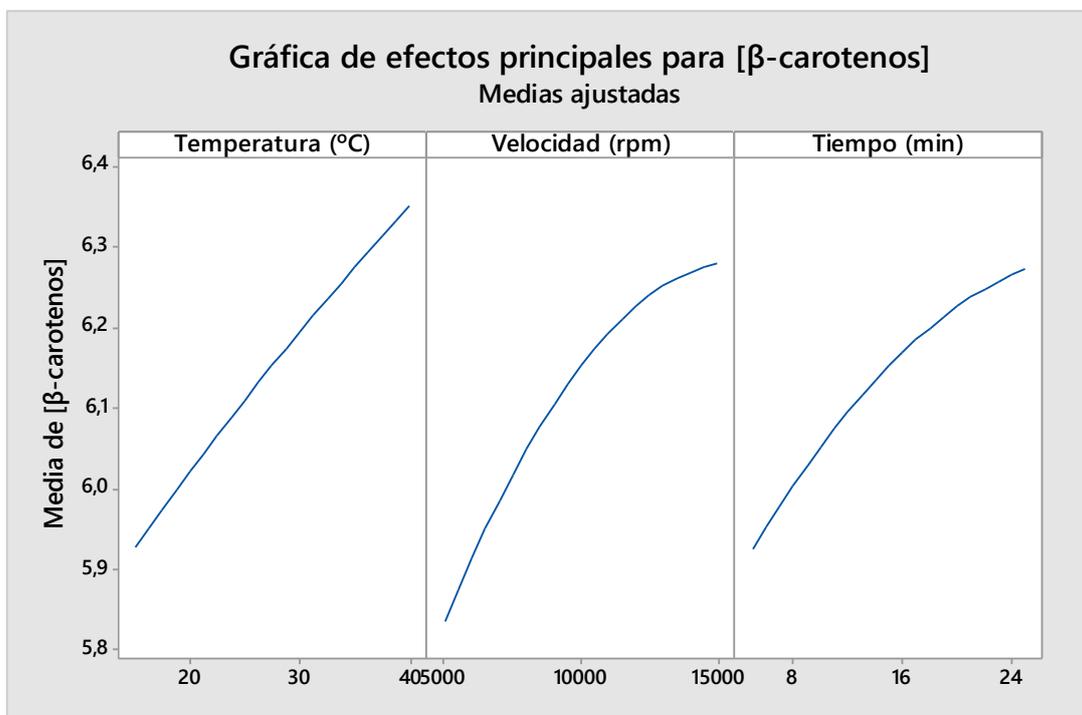


Figura 23. Efecto de la temperatura (°C), la velocidad de giro (rpm), y el tiempo (min) en la extracción de β -carotenos equivalentes del plasma de la yema de huevo.

Al modelizar el proceso mediante un diseño Box-Behnken se obtiene que las tres variables analizadas tienen un efecto lineal significativo en el proceso, y al igual que en el anterior apartado, se mantuvieron los efectos cuadráticos y de interacción entre factores debido a que el modelo resultante mostraba mejores coeficientes de determinación. En este caso, la R^2 tiene un valor del 95,55%, y la R^2 ajustada del 87,55%.

En cuanto a la magnitud del efecto que tiene cada variable en el proceso, la variable con una influencia mayor es la velocidad de giro, con un efecto de 0,4437, después esta la temperatura, con 0,4228, y por último el tiempo, con 0,3480 (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos del plasma de la yema de huevo.

Modelo	Valor P	Valor F	Coefficientes estimados	Efecto
Temperatura	0,002	36,04	0,2114	0,4228
Velocidad	0,001	39,71	0,2219	0,4437
Tiempo	0,004	24,42	0,1740	0,3480
Temperatura*Temperatura	0,804	0,07	-0,0136	-0,0272
Velocidad * Velocidad	0,124	3,40	-0,0956	-0,1912
Tiempo*Tiempo	0,342	1,10	-0,0543	-0,1087
Temperatura* Velocidad	0,797	0,07	-0,0135	-0,0270
Temperatura*Tiempo	0,162	2,70	-0,0818	-0,1635
Velocidad *Tiempo	0,608	0,30	-0,0272	-0,0545
Falta de ajuste	0,011	89,99	-	-

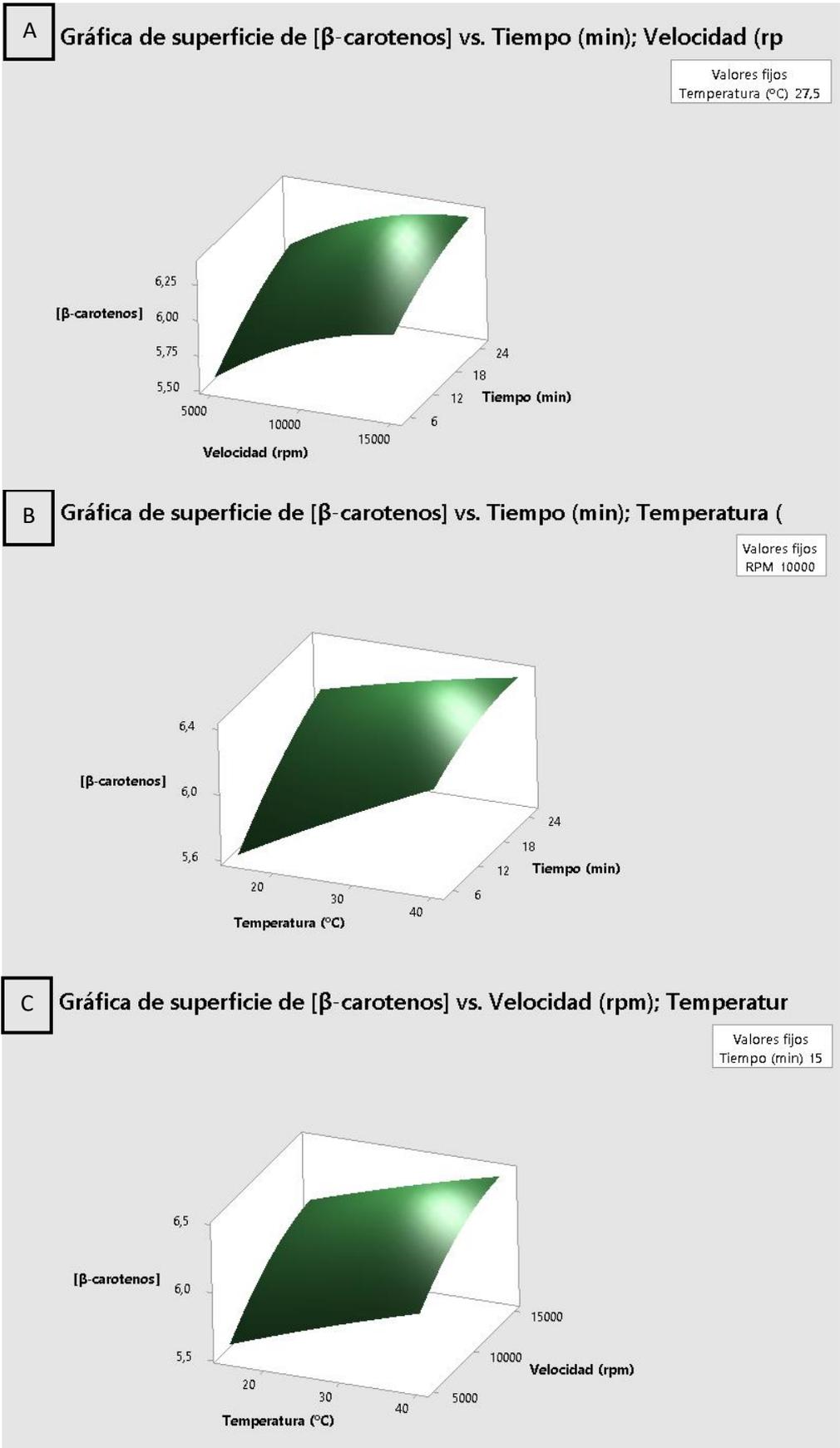


Figura 24. Efecto en la extracción de β -carotenos de plasma de: tiempo y velocidad (A), tiempo y temperatura (B), y velocidad y temperatura (C).

En las representaciones gráficas de la superficie de respuesta (Figura 24) se puede observar como la tendencia de las curvas es ascendente hasta que se alcanzan los máximos valores de los parámetros estudiados, momento en el cual las superficies de respuesta tienden a aplanarse. Este hecho sugiere que en este caso, teniendo en cuenta los factores evaluados, no es posible maximizar mucho más la extracción de β -carotenoides ya sea aumentando la velocidad de agitación, el tiempo o la temperatura de extracción.

Centrándonos en la Figura 24.A, se puede ver que para velocidades de agitación bajas (5000 rpm), el efecto que tiene el tiempo es significativamente mayor que para velocidades de agitación altas (15000 rpm). Esto mismo ocurre en la representación de la temperatura frente al tiempo, siendo la pendiente correspondiente al tiempo para temperaturas bajas (15 °C) considerablemente superior que la pendiente cuando se trabaja a temperaturas elevadas (40 °C) (Figura 24.B). Por último, en la Figura 24.C se puede observar como el incremento en la extracción de β -carotenos equivalentes a medida que aumenta la velocidad de giro es prácticamente el mismo independientemente de que se trabaje a 15 °C o a 40 °C.

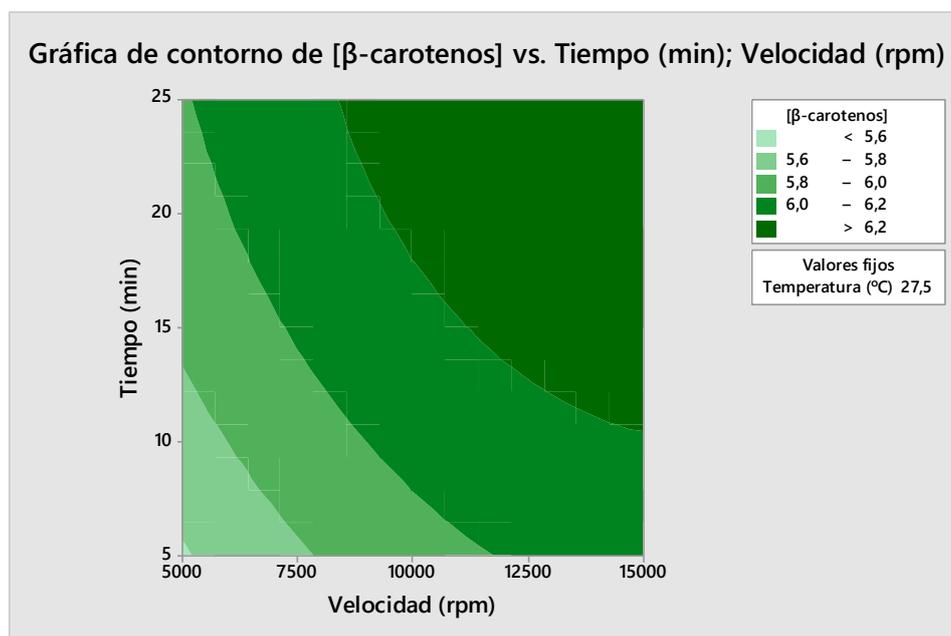


Figura 25. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g}/\text{mL}$) extraídos de plasma. La temperatura se ha fijado a 27,5 °C.

La gráfica de contorno para la extracción a partir de plasma muestra, en primer lugar, que cuando la temperatura se fija a 27,5 °C, la concentración mínima de β -carotenos equivalentes obtenida va a ser superior que la mínima que había cuando la extracción se realizaba a partir de la yema completa. Por otra parte, se observa como la extracción

máxima para este componente a 27,5 °C se da en un rango bastante amplio de valores de las variables, entre los que se incluyen las extracciones realizadas con el máximo de velocidad y de tiempo, y también las realizadas a 15000 rpm pero solo durante 15 minutos o 25 minutos pero a 10000 rpm (Figura 25). Al igual que ya ocurría trabajando con la yema completa, a la temperatura fijada los valores mínimos de extracción solo se dan cuando las dos variables restantes toman los valores mínimos analizados (Figura 25). Por último, señalar que para conseguir los valores máximos de extracción sería necesario trabajar a temperaturas superiores (40 °C) (Figura 25).

La ecuación de regresión que se obtiene para la extracción de β -carotenos en unidades no codificadas es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 [\beta - \text{carotenos}] &= 4,002 + 0,0337 * \text{Temperatura} + 0,000135 * \text{Velocidad} + 0,0571 \\
 &* \text{Tiempo} - 0,000087 * \text{Temperatura} * \text{Temperatura} - 0,000543 \\
 &* \text{Tiempo} * \text{Tiempo} - 0,000654 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} \\
 &- 0,000001 * \text{Velocidad} * \text{Tiempo}
 \end{aligned}$$

4.3.3. Extracción de carotenoides de los gránulos

Los resultados de la extracción de β -carotenos equivalentes a partir de los gránulos de la yema de huevo se muestran en la siguiente tabla (Tabla 10).

Tabla 10. Extracción de β -carotenos de los gránulos de la yema de huevo.

Temperatura (°C)	Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	Absorbancia (450nm)	β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/ml}$)
15	5000	5	0,230	2,578
		15	0,245	2,783
		25	0,270	3,124
	10000	5	0,254	2,906
		15	0,285	3,329
		25	0,296	3,479
	15000	5	0,283	3,302
		15	0,300	3,533
		25	0,298	3,506
27,5	5000	5	0,220	2,442
		15	0,254	2,906
		25	0,260	2,988
	10000	5	0,285	3,329
		15	0,287	3,356
		25	0,300	3,533
	15000	5	0,261	3,001
		15	0,286	3,342
		25	0,297	3,492
40	5000	5	0,270	3,124
		15	0,276	3,206
		25	0,280	3,261
	10000	5	0,271	3,138
		15	0,284	3,315
		25	0,293	3,438
	15000	5	0,252	2,879
		15	0,276	3,206
		25	0,290	3,397

Como cabía esperar, la concentración de β -carotenos equivalentes que se extraen de los gránulos de la yema de huevo es mucho menor que las obtenidas en el plasma y en la yema completa, siendo en los gránulos la extracción media de 3,181 $\mu\text{g/ml}$ frente a la que presentan en promedio la yema completa y el plasma que es de 5,938 $\mu\text{g/ml}$. Además, se observa que, si bien las velocidades y el tiempo afectan en rangos similares a lo ocurrido en el plasma y la yema, el efecto de la temperatura en la extracción a partir de los gránulos es menor.

En el caso de los gránulos se puede ver como el efecto de la temperatura en el proceso depende mucho de las velocidades aplicadas, siendo las pérdidas al realizar la extracción a 15 °C frente a los 40 °C máximos del 17,47% para 5000 rpm, del 7,39% para 10000 rpm y presentando una ganancia del 14,69% cuando la velocidad de giro es de 15000 rpm.

En cuanto a la velocidad de agitación, la diferencia entre aplicar 5000 rpm o 15000 rpm cuando el tiempo de extracción son 15 minutos es del 21,23% para 15 °C, del 13,06% para 27,5 °C y del 0% para 40 °C. Se puede observar como a tiempo constante, a medida que aumenta la temperatura a la que se realiza el proceso, la velocidad de agitación que se aplica va tomando menos relevancia.

Por último, la diferencia entre realizar la extracción durante 5 minutos o durante 25 minutos, fijando la temperatura a 15 °C, supone unas pérdidas del 17,47% para 5000 rpm, del 16,47% para 10000 rpm, y del 5,84% para 15000 rpm, por lo que el tiempo tiene una influencia mayor en la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos cuando se aplican velocidades de agitación medias y bajas.

Gráficamente esto se traduce en curvas con tendencia ascendente para la velocidad y el tiempo, ya que a mayor valor de estas variables, mayor concentración de β -carotenos se obtiene, mientras que para la temperatura la curva toma una forma cóncava, que implica que, contra lo esperado, a 27,5°C se obtienen concentraciones menores de β -carotenos que a 15°C (Figura 26).

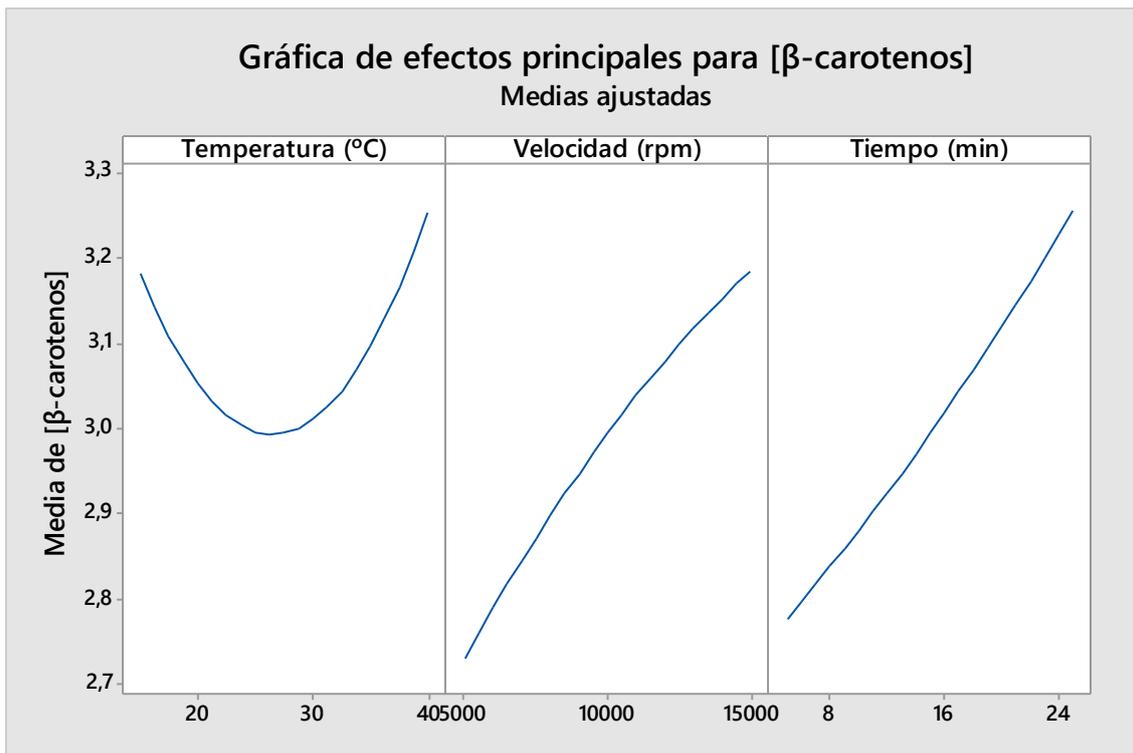


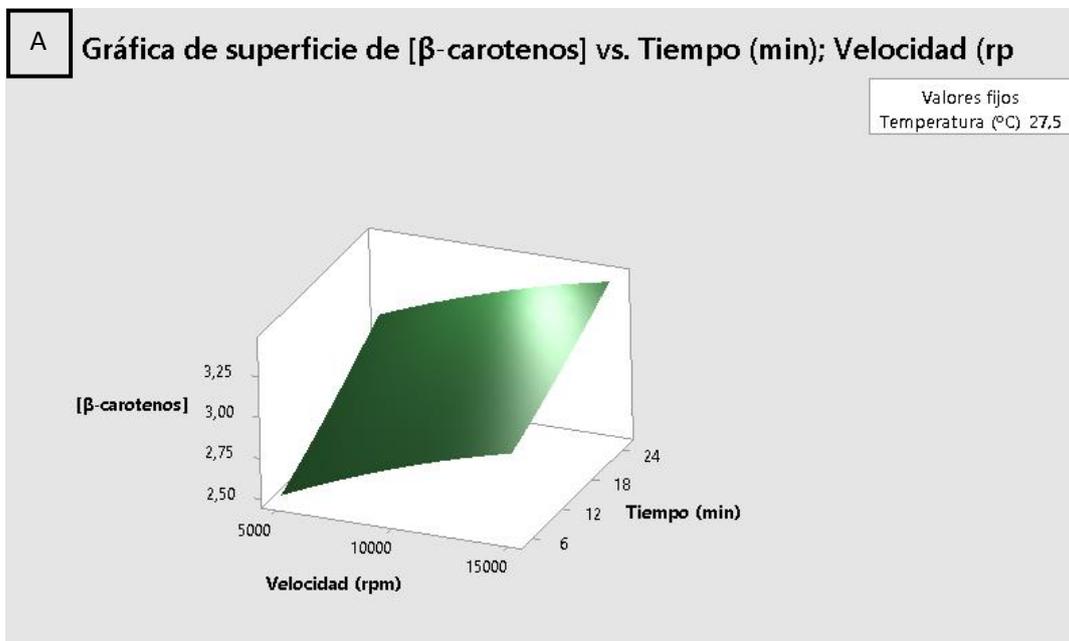
Figura 26. Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), velocidad de giro (rpm), y tiempo (min), en la extracción de β -carotenos equivalentes de los gránulos de la yema de huevo.

El diseño experimental Box-Behnken indica que, para los gránulos, únicamente es significativo el efecto que tienen en la extracción la velocidad de giro y el tiempo. En este caso, además de descartarse los efectos cuadráticos y de interacción entre dos factores, la temperatura tampoco afecta significativamente al proceso (Tabla 11). Además, cabe señalar que el ajuste de este modelo es peor que en los anteriores componentes, siendo los valores de R^2 y de R^2 ajustado de 81,59% y 48,45% respectivamente.

En cuanto al efecto que ejerce cada variable, la que más afecta es el tiempo, con un valor de 0,4775, mientras que a la velocidad le corresponde un valor 0,4532. El efecto que causa la temperatura únicamente es de 0,0717 (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza del modelo de regresión obtenido para el proceso de extracción de β -carotenos de los gránulos de la yema de huevo.

Modelo	Valor P	Valor F	Coefficientes estimados	Efecto
Temperatura	0,685	0,19	0,0359	0,0717
Velocidad	0,042	7,39	0,2266	0,4532
Tiempo	0,035	8,20	0,2388	0,4775
Temperatura*Temperatura	0,128	3,31	0,223	0,447
Velocidad * Velocidad	0,781	0,09	-0,036	-0,072
Tiempo*Tiempo	0,864	0,03	0,022	0,044
Temperatura* Velocidad	0,173	2,53	-0,187	-0,375
Temperatura*Tiempo	0,588	0,33	-0,068	-0,136
Velocidad *Tiempo	0,912	0,01	-0,014	-0,027
Falta de ajuste	0,985	0,04	-	-



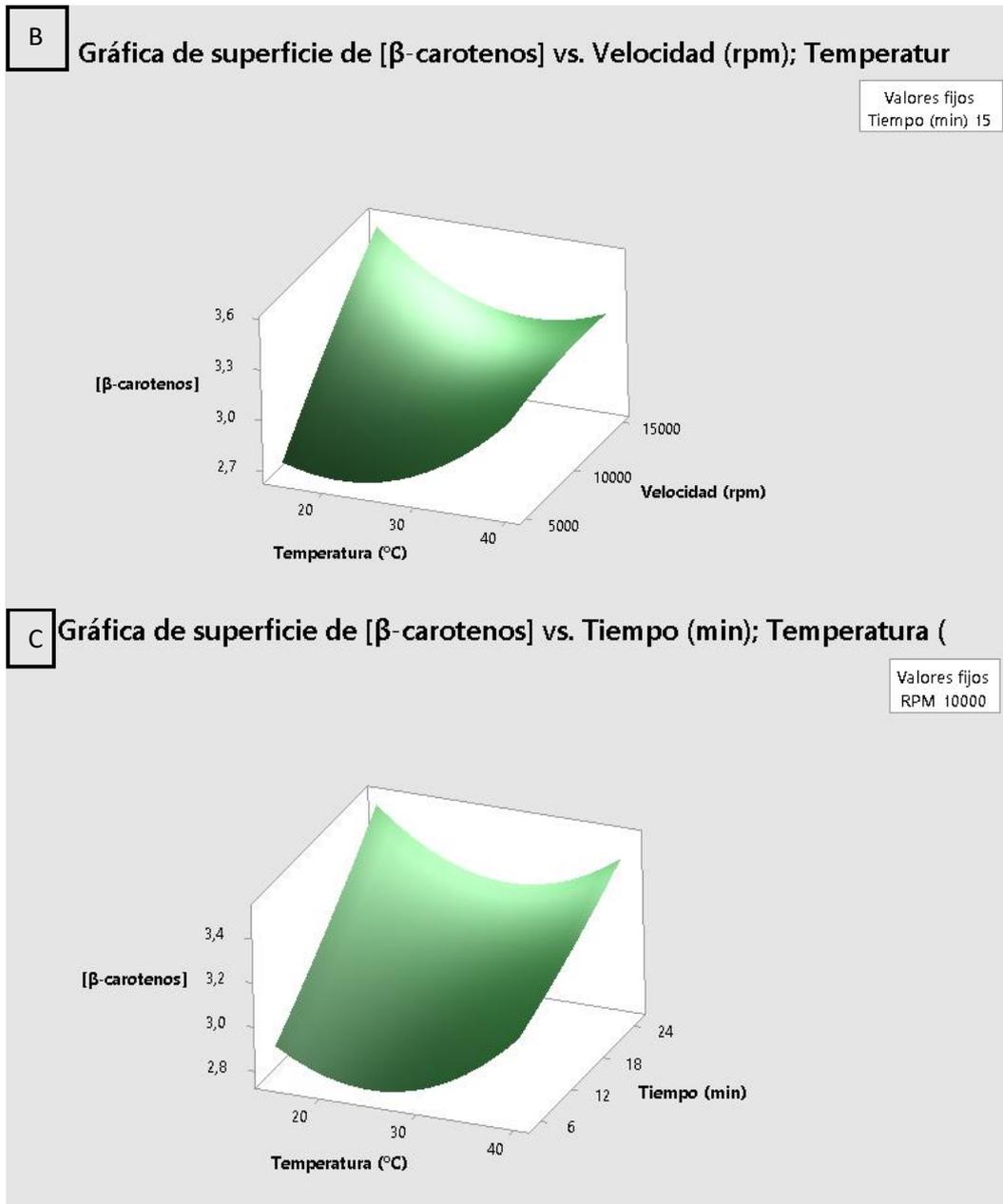


Figura 27. Gráfica de superficie de concentración de β -carotenos frente a: tiempo y velocidad (A), velocidad y temperatura (B), y tiempo y temperatura (C).

En las gráficas de superficie de respuesta con las diferentes combinaciones de las variables se puede ver cómo, para los ejes de tiempo y velocidad, la tendencia de la curva es a aumentar de valor a medida que se avanza en el eje, mientras que en los ejes en los que se encuentra la temperatura aparece la forma cóncava ya mencionada anteriormente (Figura 27). A pesar de que el efecto de la temperatura en la concentración de β -carotenos extraídos de los gránulos no siga una tendencia clara, en los gránulos no se alcanza el punto óptimo de extracción en las condiciones en las que se trabaja, al no alcanzarse ningún plato después del máximo de extracción detectado.

En la Figura 27 se puede ver cómo, si bien para las distintas velocidades de agitación no se observan grandes diferencias en el incremento de la concentración de β -carotenos equivalentes provocado por un aumento en el tiempo (Figura 27.A), cuando se analiza la temperatura frente a la velocidad las diferencias se acentúan, siendo mucho mayor el incremento en los β -carotenos equivalentes extraídos cuando aumenta la velocidad de giro aplicada a 15 °C, frente a la pendiente casi nula de la curva cuando el incremento en las velocidad ocurre a 40 °C (Figura 27.B). Por último, representando la temperatura frente al tiempo, también se observa que el efecto de aumentar el tiempo de extracción se traduce en un incremento mayor de la concentración de β -carotenos equivalentes cuando la temperatura es baja (Figura 27.C).

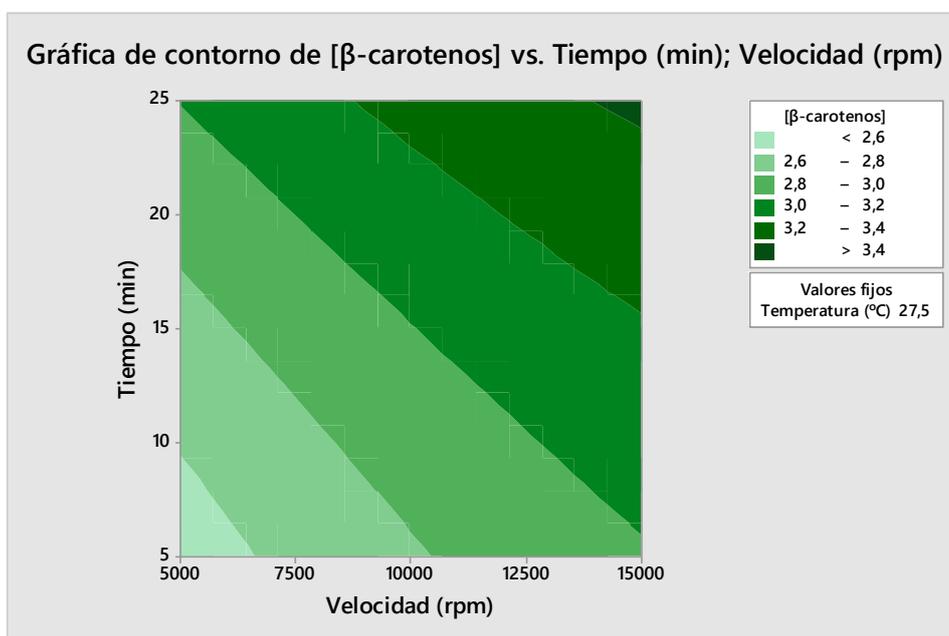


Figura 28. Gráfica de contorno de la concentración de β -carotenos equivalentes ($\mu\text{g/mL}$) extraídos de los gránulos. La temperatura se ha fijado a 27,5 °C.

En la gráfica de contorno adjunta se observa como a 27,5 °C, los valores de concentración menores de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ solo se obtienen cuando se trabaja a las mínimas rpm y al mínimo tiempo de extracción analizado (Figura 28). En el otro extremo, para conseguir valores superiores a 3,4 $\mu\text{g/mL}$, es necesario operar a la máxima velocidad y durante el máximo tiempo (Figura 28).

La ecuación de regresión en unidades no codificadas obtenida para los gránulos es la siguiente:

[β – carotenos]

$$\begin{aligned} &= 2,00 - 0,0376 * \text{Temperatura} + 0,000161 * \text{rpm} + 0,0350 \\ &* \text{Tiempo} + 0,001430 * \text{Temperatura} * \text{Temperatura} + 0,00022 \\ &* \text{Tiempo} * \text{Tiempo} - 0,000003 * \text{Temperatura} * \text{rpm} - 0,000546 \\ &* \text{Temperatura} * \text{Tiempo} \end{aligned}$$

4.3.4. Extracción de carotenoides de la yema de huevo y sus fracciones. Discusión.

De manera global, si comparamos la extracción de β -carotenos en la yema completa y en el plasma, se puede ver como el proceso se desarrolla de igual manera en ambos casos, y que las variables que le afectan de manera significativa son las mismas. A pesar de que las variables estudiadas presentan influencia en el proceso en ambos casos, el efecto que estas ejercen sobre el mismo es ligeramente inferior en el plasma. Esto puede ser debido a que, dada la previa separación de la yema en sus fracciones, los β -carotenos se encuentran más accesibles en el plasma y por lo tanto se extraen más fácilmente independientemente de las condiciones. Además, hay que tener en cuenta que, en los experimentos realizados con plasma, los 4 g añadidos van a ser únicamente de plasma, que es la fracción en la que se encuentran principalmente los β -carotenos, mientras que en los de la yema completa una fracción de esos 4g van a ser gránulos, con un contenido de β -carotenos menor. Estos mismos motivos explican la pequeña diferencia que se observa en las concentraciones de β -carotenos que se obtienen al realizar las extracciones, siendo el valor medio para la yema completa de 5,859 $\mu\text{g/ml}$ y para el plasma de 6,017 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, las extracciones máximas conseguidas presentan valores similares cuando se trabaja con la yema y con el plasma, por lo que ambos componentes son igual de válidos para la obtención de β -carotenos (Tablas 6 y 8). Estas extracciones máximas se consiguen cuando se desarrolla el proceso a las máximas temperaturas, tiempos, y velocidades de agitación evaluadas, sin embargo, en función de la concentración que se necesite, y de la cantidad de energía y tiempo que se quiera emplear, existen condiciones menos agresivas en las que se pueden conseguir extracciones buenas con un gasto menor. Por ejemplo, trabajando en las condiciones intermedias, a 27,5 °C, que es la temperatura más cercana a la ambiental y por lo tanto la que menos gasto energético supone, a 10000 rpm, y dejando el proceso durante 15 minutos, la pérdida respecto a la máxima extracción es únicamente del 10,38% para la yema completa, y del 5,04% para el plasma.

En cuanto a los gránulos, la cantidad de β -carotenos equivalentes obtenidos de la extracción a partir de esta fracción es mucho menor, y además, el proceso resulta más difícil de modelizar que en el caso de la yema completa y el plasma, por lo que esta fracción no sería una buena opción a la hora de extraer estos carotenoides. Sin embargo, tal y como se explica en el siguiente apartado, esta fracción se puede revalorizar si se emplea con otros fines.

4.4. Determinación de proteínas

La menor cantidad de β -carotenos equivalentes presente en los gránulos de la yema de huevo se ve compensada con un mayor contenido proteico en esta fracción [21]. Además, como se puede ver en la Tabla 12, una vez realizada la extracción, la concentración de proteínas en la muestra aumenta.

Tabla 12. Porcentaje de nitrógeno y de peso de proteína en las muestras antes y después de realizar la extracción de carotenoides.

Muestra	% Nitrógeno	% Proteína
Antes de la extracción	8,72	54,50
Después de la extracción	10,20	63,76

4.5. Determinación de la capacidad antioxidante

Una vez extraídos los β -carotenos de la yema de huevo se ensayó la capacidad antioxidante in vitro de las extracciones en aceite de girasol para determinar si este aceite presentaba una mayor capacidad antioxidante de la que tiene el aceite de girasol por sí mismo.

Para llevar a cabo el método DPPH se seleccionó una muestra con una cantidad elevada de β -carotenos equivalentes, en concreto la resultante de una extracción a partir de plasma de la yema de huevo realizada a 40 °C, durante 25 minutos, y a 10000 rpm.

Los resultados obtenidos determinaron que la capacidad antioxidante del aceite con los β -carotenos de la yema de huevo es un 16,33% mayor. Teniendo en cuenta que este aceite con β -carotenos va a ser introducido en los sustitutivos de grasa, el hecho de que esté presente una capacidad antioxidante mayor supone una ventaja tecnológica que puede ser útil para extender la vida útil del producto en el que se incorpore.

4.6. Caracterización del sustitutivo de grasa con β -carotenos

Una vez conocidas cuales son las mejores condiciones para extraer β -carotenos y cuál es la composición que mejor actúa como sustitutivo de grasa, se realizó la mejor extracción de cada componente, y se empleó el aceite con β -carotenos resultante para introducirlo en el sustitutivo.

Los geles del sustitutivo de grasa se realizaron con un 5% de carragenato y con un 100% de aceite en la fracción destinada a aceite vegetal o grasa animal. Por otra parte, las condiciones seleccionadas para las extracciones fueron, para la yema completa y el plasma, 40 °C, 10000 rpm y 25 minutos, mientras que para los gránulos, 27,5 °C, 10000 rpm y 25 minutos.



Figura 29. Aceite resultante de la extracción de β -carotenos de yema de huevo (izquierda), plasma (centro), y gránulos (derecha).

Como se puede ver en la imagen adjunta, en el caso de las extracciones de la yema completa y del plasma, la tonalidad del aceite resultante es más anaranjada, sin apreciarse diferencias a simple vista entre ambos tubos (Figura 29). Sin embargo, en el caso del aceite resultante de la extracción de los gránulos, el color final es más pálido, y sí que se observa una diferencia significativa respecto a la tonalidad obtenida cuando la concentración de β -carotenos es mayor (Figura 29). Esta diferencia de color en las muestras es de gran importancia, no solo por la implicación en la cantidad de β -carotenos que presentan, sino también por el color que van a adquirir los geles que las contengan.

A la hora de realizar un sustitutivo de grasa es de gran importancia que el aspecto final del mismo sea apetecible para el consumidor, y que además sea adecuado para el producto

en el cual se va a introducir. De esta manera, existen aplicaciones en las cuales el color blanco de estos sustitutivos es deseable o no tiene una gran repercusión, y otras en las cuales el aspecto tan blanquecino afecta negativamente a la apariencia final de producto a comercializar. Teniendo en cuenta que el color final del sustitutivo de grasa va determinado por el color del aceite que se emplea en su síntesis, cuantos más β -carotenos presente un aceite y, en consecuencia, más anaranjado sea, mejor será el aspecto final del gel para algunas aplicaciones, como por ejemplo para la ya mencionada morcilla, o en general para cualquier producto del sector cárnico.

Las medias de los resultados obtenidos para el color de los geles antes y después del tratamiento térmico a 90 °C se muestran en la tabla adjunta (Tabla 13).

Tabla 13. Medición de color antes y después del baño.

Muestra	Antes del tratamiento a 90 °C			Después del tratamiento a 90 °C		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Blanco	87,0	-0,1	4,3	87,9	-0,7	4,9
Yema 100%	78,9	1,2	15,5	81,0	0,5	15,8
Yema 50%	85,4	-0,4	6,2	88,1	-2,0	6,9
Plasma 100%	76,0	1,2	16,6	78,2	0,5	17,5
Plasma 50%	80,1	0,9	11,3	84,2	-0,9	11,7
Gránulos 100%	75,1	0,4	9,6	80,0	-1,1	10,3
Gránulos 50%	79,0	-0,6	6,3	83,8	-2,0	6,8

En primer lugar, analizando el color de los geles antes del calentamiento, se puede ver como su luminosidad (L*) es menor en las muestras con un contenido mayor de β -

carotenos (muestras en las que el 100% del aceite empleado es el resultante de la extracción), mientras que en las muestras en las que se ha realizado una dilución, el valor de luminosidad se encuentra más cercano al blanco, que presenta el valor más alto de luminosidad (Tabla 13).

En cuanto a la a^* , los valores positivos indican una tonalidad rojiza, que como cabía esperar aparece más marcada en las muestras con una cantidad elevada de β -carotenos (yema 100% y plasma 100%), frente a valores negativos que indican una tonalidad más verdosa, y que aparecen en el blanco y en algunas de las muestras en las que se ha realizado dilución (Tabla 13).

La b^* , que indica amarillo en positivo y azul en negativo, aparece positiva en todas las muestras, pero se observa como su valor es más elevado en las muestras con una mayor cantidad de β -carotenos, y que a medida que esta cantidad disminuye, los valores se encuentran más próximos al del blanco (Tabla 13).

Una vez sometidas las muestras a 90°C se vio que la luminosidad aumentaba ligeramente en todas ellas, pero que se mantenían las diferencias observadas en función de la concentración de β -carotenos (Tabla 13). En la a^* sin embargo, aunque también se mantuvieron las diferencias en función de la cantidad de β -carotenos, se observó el efecto contrario, tras el baño todas las muestras sufrieron una disminución en su valor de a^* , y por lo tanto se volvieron un poco más verdosas (Tabla 13). Para la b^* , con el baño los valores de todas las muestras aumentaron ligeramente, pasando los geles a ser más amarillentos (Tabla 13).

Los cambios generados en el color de los geles después del tratamiento térmico pueden ser debidos a la termolabilidad de los carotenoides. Estos compuestos comienzan a verse afectados por la temperatura cuando esta alcanza un valor de 60 °C aproximadamente [28], y en este caso, el baño es a 90 °C, por lo que una parte de los carotenoides presentes en el aceite van a ser degradados. Tanto el aumento de la luminosidad como la disminución de la tonalidad rojiza se explican por un descenso en la concentración de carotenoides, ya que, además, la disminución que presentan las muestras en estos parámetros es superior a la disminución que presenta la muestra blanco. Sin embargo, el incremento en el aspecto amarillento de los geles no estaría provocado por la destrucción de los carotenoides, ya que el aumento que se observa en este parámetro en las muestras es similar al aumento que tiene lugar en el blanco.

En conclusión, las muestras con una concentración mayor de β -carotenos, es decir, la de 100% de yema y la de 100% de plasma, son las que mejores propiedades tienen, no solo por su composición, sino también por ser las que presentan una menor luminosidad, una mayor tonalidad rojiza, y un aspecto más amarillento, todas ellas características que se buscan para sintetizar un sustitutivo con una apariencia no tan marmolea y que podría ser útil como sustitutivo de grasa en productos que requieren tonalidades más rojizas, como por ejemplo productos cárnicos cocidos como morcillas (Tabla 13). Además, con el baño se potencia la tonalidad amarillenta, si bien es cierto que la luminosidad aumenta ligeramente y las muestras se vuelven un poco más verdosas (Tabla 13).



Figura 30. Sustitutos de grasa con las diferentes muestras de aceite: blanco (1), yema 100% (2), yema 50% (3), plasma 100% (4), plasma 50% (5), gránulos 100% (6), y gránulos 50% (7).

A simple vista se puede comprobar claramente como las muestras con el 100% del aceite obtenido a partir de la extracción de la yema completa y del plasma (muestras 2 y 4), son las que presentan un aspecto más anaranjado, y por lo tanto más diferente del blanco (muestra 1), que presenta una tonalidad blanquecina (Figura 30). Por otra parte, la muestra que contiene el aceite resultado de la extracción de los gránulos (muestra 6), si bien no se aprecia un color tan anaranjado como en los casos anteriormente mencionados, si que se consigue evitar el aspecto de la muestra blanco (muestra 1) (Figura 30). Como cabía esperar, en las muestras en las que se realiza una dilución del aceite (muestras 3,5, y 7), el aspecto de los geles resultantes presenta unas características intermedias entre el blanco (muestra 1), y las respectivas muestras con el 100% del aceite procedente de la extracción (muestras 2,4, y 6) (Figura 30).



Figura 31. Sustitutos de grasa con β -carotenos procedentes de la extracción a partir de yema de huevo completa (izquierda) y de plasma (derecha).

Para finalizar, en la fotografía adjunta se muestran los dos sustitutos de grasa que presentan las mejores propiedades, no solo en cuanto al aspecto visual, sino también debido a las características del gel, y al efecto beneficioso que estos ejercen en la salud dada la concentración de β -carotenos que contienen (Figura 31).

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido obtener un sustitutivo de grasa con carotenoides procedentes de yema de huevo en su composición. De manera individualizada, las conclusiones de este estudio son:

- La dureza de los geles del sustitutivo de grasa se encuentra directamente relacionada con la concentración de carragenato empleada para su realización, siendo los geles con un 5% de carragenato los que mayor valor de fuerza tienen.
- Los sustitutivos de grasa sintetizados con un 100% de aceite vegetal y un 0% de grasa animal presentan valores elevados de fuerza en el gel tanto antes como después de ser sometidos a tratamiento térmico.
- A la hora de extraer β -carotenos de la yema de huevo, se obtiene una concentración mayor cuando se emplean como fuente o bien el plasma o bien la yema completa, teniendo los gránulos una cantidad mucho menor.
- La temperatura, la velocidad de agitación, y el tiempo, son factores que van a afectar al proceso de extracción de β -carotenos, siendo la concentración extraída mayor a medida que aumenta el valor de cada uno de estos parámetros.
- El aceite de girasol con carotenoides resultante de la extracción se puede utilizar para realizar el sustitutivo de grasa, generando en este no solo una mejora en el aspecto visual, sino también un valor añadido debido a los beneficios que ocasiona en la salud de los consumidores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Hygreeva, M. C. Pandey, y K. Radhakrishna, «Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products», vol. 98, n.º 1. Elsevier B.V., 2014.
- [2] K. Colla, A. Costanzo, y S. Gamlath, «Fat Replacers in Baked Food Products», *Foods*, vol. 7, n.º 12, p. 192, 2018.
- [3] P. Peso-Echarri, C. Frontela-Saseta, C. A. González-Bermúdez, G. F. Ros-Berruezo, y C. Martínez-Graciá, «Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: Alginato, carragenato y ulvano», *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, vol. 47, n.º 3, pp. 373-381, 2012.
- [4] N. K. Nayak y V. Pathak, «Development and quality assessment of carrageenan incorporated low fat chevon patties», *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, n.º 9, pp. 3477-3484, 2016.
- [5] P. Vachali, P. Bhosale, y P. S. Bernstein, «Microbial carotenoids», *Methods Mol. Biol.*, vol. 898, pp. 41-59, 2012.
- [6] H. GJ, N. ZD, L. AH, S. EJ, y B. JB, «Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk.», *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 70, n.º 2, p. 247-251 5p, 1999.
- [7] B. B.B., G. G., y S. A., «Carrageenan as a functional additive in the production of cheese and cheese-like products», *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, vol. 17, n.º 2, pp. 107-116, 2018.
- [8] F. Wang, Q. Tong, J. Luo, Y. Xu, y F. Ren, «Effect of Carrageenan on Physicochemical and Functional Properties of Low-Fat Colby Cheese», *J. Food Sci.*, vol. 81, n.º 8, pp. E1949-E1955, 2016.
- [9] A. Totosaus, E. Rojas-Nery, y M. J. Franco-Fernández, «Soya bean oil/soya protein isolate and carrageenan emulsions as fat replacer in fat-reduced Oaxaca-type cheese», *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 70, n.º 4, pp. 499-505, 2017.
- [10] M. Shoaib *et al.*, «Inulin: Properties, health benefits and food applications», *Carbohydr. Polym.*, vol. 147, pp. 444-454, 2016.

- [11] L. T. Rodríguez Furlán, A. P. Padilla, y M. E. Campderrós, «Development of reduced fat minced meats using inulin and bovine plasma proteins as fat replacers», *Meat Sci.*, vol. 96, n.º 2, pp. 762-768, 2014.
- [12] J. Colmenero F. Cofrades S., Guerra M.A., Carballo J., Fernández-Martín F., «Plasma Protein and Soy Fiber Content Effect on Bologna Sausage Properties», vol. 65, n.º 2, pp. 281-287, 2000.
- [13] S. R., N. B., y K. J., «Vitamin E- Occurrence, biosynthesis by plants and functions in human nutrition», *Mini -Reviews Med. Chem.*, vol. 17, n.º 12, pp. 1039-1052, 2017.
- [14] D. T. Utama, H. Jeong, J. Kim, y S. K. Lee, «Formula Optimization of a Perilla-canola Oil (O / W) Emulsion and Its Potential Application as an Animal Fat Replacer in Meat Emulsion», vol. 38, n.º 3, pp. 580-593, 2018.
- [15] Fundación Española de la Nutrición, «Aceite de girasol», *Aceites y Grasas*, pp. 111-112, 2004.
- [16] J. Wang, N. Wu, y Y. Yang, «Determination of carotenoids in egg yolk by high performance liquid chromatography with vortex-assisted hollow fiber liquid-phase microextraction using mixed extraction solvent», *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, n.º 10, pp. 1834-1840, 2016.
- [17] A. Rodil, A. Laca, B. Paredes, M. Rendueles, Á. Meana, y M. Díaz, «Gels prepared from egg yolk and its fractions for tissue engineering», *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, n.º 6, pp. 1577-1583, 2016.
- [18] M. Anton, «Egg yolk: Structures, functionalities and processes», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, n.º 12, pp. 2871-2880, 2013.
- [19] A. Laca, B. Paredes, M. Rendueles, y M. Díaz, «Egg yolk granules: Separation, characteristics and applications in food industry», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 59, n.º 1, pp. 1-5, 2014.
- [20] A. Laca, B. Paredes, M. Rendueles, y M. Díaz, «Egg yolk plasma: SEPARATION, characteristics and future prospects», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 62, n.º 1, pp. 7-10, 2015.
- [21] D. Valverde, A. Laca, L. N. Estrada, B. Paredes, M. Rendueles, y M. Díaz, «Egg

- yolk and egg yolk fractions as key ingredient for the development of a new type of gels», *Int. J. Gastron. Food Sci.*, vol. 3, pp. 30-37, 2016.
- [22] R. K. Saini y Y.-S. Keum, «Carotenoid extraction methods: A review of recent developments.», *Food Chem.*, vol. 240, n.º April 2017, pp. 90-103, 2018.
- [23] L. E. Ordóñez-Santos, L. X. Pinzón-Zarate, y L. O. González-Salcedo, «Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 27, pp. 560-566, 2015.
- [24] T. Tsiaka *et al.*, «Macular carotenoids in lipid food matrices: DOE-based high energy extraction of egg yolk xanthophylls and quantification through a validated APCI(+) LC-MS/MS method», *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1096, n.º June, pp. 160-171, 2018.
- [25] S. R. Pour Hosseini, O. Tavakoli, y M. H. Sarrafzadeh, «Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*», *J. Supercrit. Fluids*, vol. 121, pp. 89-95, 2017.
- [26] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, y L. A. Escaleira, «Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.», *Talanta*, vol. 76, n.º 5, pp. 965-77, 2008.
- [27] S. L. C. Ferreira *et al.*, «Multivariate optimization techniques in food analysis – A review», *Food Chem.*, vol. 273, pp. 3-8, 2019.
- [28] Y. Li, A. S. Fabiano-Tixier, V. Tomao, G. Cravotto, y F. Chemat, «Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 20, n.º 1, pp. 12-18, 2013.
- [29] R. D. Etheridge, G. M. Pesti, y E. H. Foster, «A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory», *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 73, n.º 1-2, pp. 21-28, 1998.
- [30] H. Tanzadehpanah, A. Asoodeh, y J. Chamani, «An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates», *Food Res. Int.*,

vol. 49, n.º 1, pp. 105-111, 2012.

- [31] Y. S. Choi *et al.*, «Effects of replacing pork back fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters», *Meat Sci.*, vol. 84, n.º 3, pp. 557-563, 2010.
- [32] K. Ryder, «The Design of Experiments: Statistical Principles for Practical Application. By R. Mead. Cambridge: Cambridge University Press (1989), pp. 620, £65.00.», *Exp. Agric.*, vol. 26, n.º 2, pp. 242-242, 1990.
- [33] G. Y. Lee y S. N. Han, «The Role of Vitamin E in Immunity», *Nutrients*, vol. 10, n.º 11, pp. 1-18, 2018.