

HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE RESIDUOS DE ANCHOVETA (*Engraulis ringens*) PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITE CRUDO

ENZYMATIC HYDROLYSATE OF ANCHOVY RESIDUES (*Engraulis ringens*) FOR CRUDE OIL EXTRACTION

^{1,2}Diana Aranda Pariasca, ²Miguel Albrecht-Ruiz

¹Tesis UNALM. ²DGITTP. Instituto Tecnológico de la Producción.
Carretera a Ventanilla km 5,2 Callao. daranda@itp.gob.pe

RESUMEN

Aranda D, Albrecht-Ruiz M. 2013. Hidrolizado enzimático de residuos de anchoveta (*Engraulis ringens*) para la extracción de aceite crudo. *Bol. Invest. Inst. Tecnol. Prod. Perú 11: 35-43*. - Se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), con cuatro variables independientes (temperatura, tiempo de hidrólisis, dosificación de enzima comercial y proporción de agua: materia prima), para la extracción de la mayor cantidad de aceite de los residuos frescos de anchoveta. Se llevaron a cabo dos diseños centrales compuestos (DCC), con 30 experimentos cada uno, evaluándose la cantidad de aceite extraído. Los resultados se procesaron en un paquete estadístico (STATGRAPHICS® Plus 5.1), obteniéndose las condiciones óptimas: 54 °C, 44 min de tiempo de hidrólisis, 3% de enzima y una proporción de agua: materia prima de 0,5:1. Posteriormente se realizó otra prueba de extracción de aceite con las condiciones optimizadas, obteniéndose el 69,7 ± 1,7% de contenido graso total, presentando las siguientes características 28,6% de omega 3 (EPA + DHA); 5,63% como ácido oleico; 12,7 meq O₂/kg de aceite; 2,3% de materia insaponificable; 0,97 de TBA; 26,5 de valor anisidina; 0,13% de humedad; 0,93 de peso específico y en color los valores L*, a*, b* de 30,07; 11,76 y 20,75.

PALABRAS CLAVE: anchoveta, enzimas, residuos de pescado, aceite, metodología superficie de respuesta.

ABSTRACT

Aranda D, Albrecht-Ruiz M. 2013. Enzymatic hydrolysate of anchovy residues (*Engraulis ringens*) for crude oil extraction. *Bol. invest. Inst. tecnol. Prod. Perú 11: 35-43*. - Response Surface Methodology (RSM) was used with four independent variables (temperature, hydrolysis time, commercial enzyme dosage and ratio of water: raw material), in order to optimize oil extract from fresh anchovy residues. Two core designs compounds (CDC) were performed with 30 experiments each and the amount of extracted oil was evaluated. Results were processed by a software (STATGRAPHICS® Plus 5.1) and the following optimal conditions were obtained: 54 °C, 44 min hydrolysis time, 3% enzyme and a water:raw material ratio of 0,5:1. When those optimized conditions were applied, 69,7 ± 1,7% of the total fat content was extracted yielding a product with the following contents and physical and chemical characteristics: 28,6% omega 3 (EPA + DHA), 5,63% as oleic acid, 12,7 meq O₂/kg peroxide value, 2,3% unsaponifiable matter, 0,97 TBA value; 26,5 anisidine value; 0,13% moisture; 0,93 specific gravity; and L*, a* and b* values of 30,07; 11,76 and 20,75; respectively, for color evaluation.

KEYWORD: anchovy, enzyme, fish residues, oil, response surface methodology.

INTRODUCCIÓN

En la última década, el Perú ha incrementado el CHD de la anchoveta llegando en el 2012 a 79145 t (PRODUCE

2013). Considerando, que los residuos constituyen aproximadamente el 40 % (IMARPE/ITP 1996) del peso total de la anchoveta, se generaría 31658 t de residuos, los cuales actualmente se destinan para

la elaboración de harina residual, de baja calidad por su alto contenido de cenizas.

En el Perú se registraron algunos estudios de aplicación de enzimas en especies marinas tal como el realizado por DÁVILA (1972), quien aplicó la hidrólisis enzimática en la pulpa de merluza para valorar y cuantificar aminoácidos azufrados por medio de técnicas cromatográficas; con el fin de conocer el aporte del pescado en estos aminoácidos. CANDELA (1990) usó la enzima proteolítica bromelina en la pulpa de merluza (*Merluccius gayi peruanus*) con el propósito de desdoblar las proteínas para obtener un concentrado soluble de pescado y determinar las constantes cinéticas de su proceso.

En los últimos años debido a la disponibilidad de diversas enzimas comerciales y a la multiplicidad de su acción sobre diferentes sustratos se ha ampliado su aplicación, principalmente en residuos de pescado al respecto, DUMAY et al. (2004), en un proyecto de la Unión Europea, obtuvo lípidos de los residuos (cabeza, espinazo, gónadas, vísceras, piel y cortes) provenientes del procesamiento del bacalao (*Gadus morhua*) mediante hidrólisis enzimática utilizando proteasas (papaína, quimotripsina, PROTAMEX™ y FLAVOURZYME®).

El objetivo del presente trabajo fue obtener aceite crudo a partir de los residuos frescos de anchoveta (*Engraulis ringens*) resultantes del procesamiento de conservas empleando un proceso enzimático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima (mp)

Los residuos, cabezas, vísceras y colas, fueron obtenidos de anchoveta (*Engraulis ringens*) fresca (tiempo de captura <10 horas).

Material enzimático

La enzima utilizada fue Protamex™ una endoproteasa de la clase de las hidrolasas, producida por varias especies de *Bacillus sp.*

Métodos analíticos

Se realizaron las siguientes determinaciones: composición proximal (FAO 1986), Determinación de bases volátiles nitrogenadas en mg/100g (DOUE 2008), extracción de grasa en frío (BLIGH & DYER 1959), composi-

ción en ácidos grasos por cromatografía de gases (PREVOT & MORDRET 1976), utilizando un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Autosystem XL; humedad y material volátiles (ITINTEC 1968); densidad (gravimétrico); color empleando el colorímetro NIPON DENSHOKU ZÉ 2000 (sistema CIELAB); valor de TBA (AOCS 1997); acidez en porcentaje de ácido oleico (AOAC 2007); porcentaje de materia insaponificable (ITINTEC 1980); valor de anisidina (NTP 1983) y valor peróxido en meq O₂/kg de aceite (AOAC 2007).

Proceso para obtener aceite crudo del hidrolizado enzimático

Las cabezas, vísceras y colas fueron mezcladas y envasadas en porciones de 210 ± 1 g en bolsas de polietileno de alta densidad, selladas herméticamente, fueron congeladas y almacenadas a - 25 °C.

Las condiciones de hidrólisis enzimática fueron las recomendadas por el proveedor; las variables de estudio fueron: temperatura, tiempo, dosificación de enzima en base al peso de proteína y proporción de agua: materia prima. La temperatura del sistema (X₁) fue estabilizada con un baño de agua de flujo continuo, 210 ± 1 g de materia prima fue vertida a un recipiente al cual se le adicionó una cantidad de agua destilada (X₄), la cantidad de enzima (X₃) fue agregada cuando el sistema alcanzó la temperatura de trabajo. La hidrólisis fue por un tiempo determinado (X₂) y expuesta a una agitación de 60 rpm. Luego se inactivó la enzima a 85 °C por 10 min en baño maría.

El hidrolizado fue centrifugado a 2000 rpm durante 15 min, luego el aceite fue separado, vertido en tubos de vidrio, pesado, se agregó nitrógeno, se cerró y almacenó en congelación para finalmente ser sometido a los análisis correspondientes.

Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Se utilizó la MSR para optimizar la operación de hidrólisis, con una experimentación factorial. Se eligió un diseño compuesto central (DCC) rotatable con un valor de α igual a 2. Este valor de α fue obtenido según la ecuación citada por Montgomery (2002), donde k es igual al número de variables en estudio (k = 4): $\alpha = (2^k)^{1/4} = (16)^{1/4} = 2$. Por ello las columnas -2 y +2 (Tabla 1), generan los puntos estrella los

Tabla 1.- Variables y sus niveles para el primer diseño compuesto central

Variables	Símbolo	Niveles de variables codificadas (X_j)				
		-2 ($-\alpha$)	-1	0	1	2 ($+\alpha$)
Temperatura °C	X_1	35	40	45	50	55
Tiempo minutos	X_2	30	70	110	150	190
Enzima % del PPM	X_3	1	2	3	4	5
Proporción H ₂ O:m.p	X_4	0,4:1	0,8:1	1,2:1	1,6:1	2,0:1

PPM: peso de proteína en la muestra.

 $\alpha = 2$ (corresponde a un DCC rotatable)

cuales, corresponden a dos tratamientos por factor ($2k$). La porción factorial del diseño 2^k se desarrolló a partir de las columnas -1 y +1. El tratamiento de los resultados se realizó mediante regresiones múltiples y análisis de variación (MONTGOMERY 2002). Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS® Plus 5.1.

El punto central (0; 0; 0; 0) fue el único punto que se repitió para considerar la variación de repetibilidad. Cabe señalar que los niveles de la columna 0 fueron establecidos por considerarse cerca de la región del óptimo. Cada factor tomó un total de cinco niveles diferentes en el diseño, que permitió cubrir el rango de trabajo favorable para la enzima comercial.

En este caso tenemos un $k = 4$, y se decidió hacer 6 repeticiones (nr) del punto central. Esto brindó un total de 30 tratamientos que se detallan en la Tabla 3.

$$2^k + 2k + nr = 2^4 + 2 \times 4 + 6 = 30$$

Etapa I

La Tabla 1 resume la información necesaria para elaborar el DCC para la optimización. Después de haber llevado a cabo los 30 tratamientos, se estudiaron dos respuestas: 1) la extracción de aceite crudo y 2) el color obtenido.

La extracción de aceite crudo se efectuó después de centrifugar la muestra hidrolizada de cada tratamiento, fue cuantificado en gramos y también como porcentaje, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Aceite crudo extraído} = \frac{\text{Aceite extraído (g)} \times 100}{\text{Peso de grasa en la materia prima (g)}}$$

Luego de ingresar los 30 resultados de aceite en gramos en "optimización por superficie respuesta" del software

STATGRAPHICS®; se obtuvo el nivel óptimo para cada variable que generaría una máxima extracción de aceite. También se obtuvo la ecuación matemática de esta función y su coeficiente de correlación.

Se utilizó un colorímetro que usa el sistema CIELAB que mide el color en unidades L^* , a^* , b^* . Se tomó 3,2 ml de aceite y se agregó 8 ml de hexano, para cada tratamiento. En la búsqueda de un color más claro, se aplicó la fórmula de "whiteness" señalada por PARK (2000).

$$\text{Whiteness} = 100 - [(100-L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

De manera similar a la optimización de la extracción de aceite crudo, se ingresan los 30 resultados de color obtenido en "optimización por superficie respuesta" del software STATGRAPHICS, para obtener los niveles de las 4 variables estudiadas que produzcan un máximo valor de "whiteness". Además, se obtuvo una ecuación matemática con su coeficiente de correlación.

Etapa II

Se utilizó la condición óptima encontrada en la Etapa I (Tabla 6). Después de centrifugar la muestra hidrolizada se obtienen 4 fases: 1) aceite, 2) emulsión, 3) líquido y 4) lodo. Estas fueron separadas y se determinó la composición proximal, con excepción de la fase lipídica, la cual fue cuantificada para determinar el porcentaje de aceite crudo extraído y la caracterización del mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

El residuo que constituye la materia prima del estudio representó aproximadamente un 47% respecto a la anchoveta entera. En la Tabla 2 se detalla la composición proximal y física de la cabeza, cola y vísceras.

Tabla 2.- Composición proximal y física de la cabeza, vísceras, cola y materia prima provenientes de la anchoveta

	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Ceniza %	Composición física*
Cabeza	76,52	13,17	5,00	4,98	26,1 ± 1,3
Vísceras	76,20	15,34	6,11	2,23	19,3 ± 1,6
Cola	72,03	15,32	3,97	8,33	1,6 ± 0,3
Materia prima (mp)	76,84	14,03	4,95	4,15	47,0 ± 1,9

(*) Promedio ± desviación estándar de 34 especímenes con longitudes totales en el rango de 14,0 a 14,9 cm.

Tabla 3.- Primer Diseño compuesto central, resultados de la extracción de aceite (Y_1) y % de aceite extraído

Tratamiento (T)	X_1 °C	X_2 Min	X_3 % del PPM	X_4 Agua:m.p.	Y_1 Respuesta aceite (g)	% aceite crudo extraído
1	35	110	3	1,2:1	4,1145	41,56
2	40	70	2	0,8:1	3,4872	35,22
3	40	150	2	0,8:1	2,9521	29,82
4	40	70	4	0,8:1	3,9002	39,40
5	40	150	4	0,8:1	3,4146	34,49
6	40	70	2	1,6:1	3,2872	33,20
7	40	150	2	1,6:1	2,9015	29,31
8	40	70	4	1,6:1	3,3927	34,27
9	40	150	4	1,6:1	3,1696	32,02
10	45	30	3	1,2:1	3,0154	30,46
11	45	190	3	1,2:1	3,0719	31,03
12	45	110	1	1,2:1	2,7846	28,13
13	45	110	5	1,2:1	3,141	31,73
14	45	110	3	0,4:1	4,4934	45,39
15	45	110	3	2,0:1	2,9745	30,05
16	45	110	3	1,2:1	3,5723	36,08
17	45	110	3	1,2:1	3,4938	35,29
18	45	110	3	1,2:1	3,7862	38,24
19	45	110	3	1,2:1	3,6895	37,27
20	45	110	3	1,2:1	3,4195	34,54
21	45	110	3	1,2:1	3,8611	39,00
22	50	70	2	0,8:1	4,4987	45,44
23	50	150	2	0,8:1	3,126	31,58
24	50	70	4	0,8:1	3,4369	34,72
25	50	150	4	0,8:1	2,9661	29,96
26	50	70	2	1,6:1	3,5992	36,36
27	50	150	2	1,6:1	3,0456	30,76
28	50	70	4	1,6:1	4,0500	40,91
29	50	150	4	1,6:1	3,9258	39,65
30	55	110	3	1,2:1	3,7835	38,22

PPM: peso de proteína en la muestra = 28 g

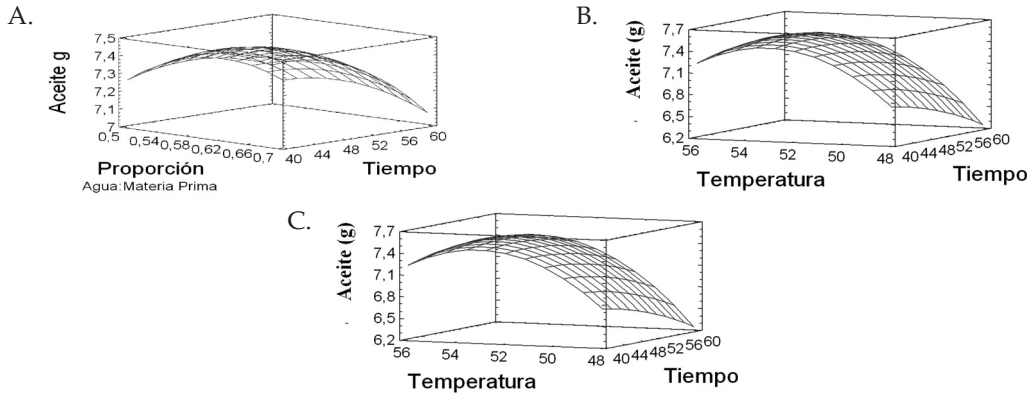


Figura 2.- Extracción de aceite en función a: (A) Temperatura y tiempo. (B) Proporción agua: materia prima y tiempo. (C) Temperatura y enzima.

Primer diseño compuesto central (DCC)

La metodología utilizada generó 30 tratamientos que se detallan en la Tabla 3 con sus respectivos resultados de aceite crudo extraído.

La optimización para cada variable, hallada por el programa estadístico, fue de 55 °C; 50 min de hidrólisis; enzima 2,3% del PPM y proporción agua: materia prima de 0,6:1; el modelo presentó un bajo coeficiente de correlación de 64,27%.

En relación al color, el nivel óptimo para obtener un color de aceite más claro reportado por el programa estadístico fue: 40 °C; 62 min; concentración de enzima 1% del PPM y proporción agua:materia prima de 2:1 (coeficiente de correlación = 88,61%). Esto nos muestra que al aplicar menores niveles de temperatura, tiempo y porcentaje de enzima, y mayor cantidad de agua se obtiene un aceite más claro, no coincidiendo con los mayores porcentajes de extracciones de aceite.

Segundo diseño compuesto central (DCC)

Considerando que el primer DCC obtuvo una baja correlación ($R^2 = 64,3\%$), se trabajó

utilizando un segundo DCC, con otra materia prima (14% de proteína y 6,1% de grasa) con 17,9 mg N- BVN /100 g y con pH de 6,39 (rango óptimo de trabajo de la enzima). Se reprogramaron los niveles para cada variable (Tabla 4), considerando el nuevo punto central a los valores óptimos obtenidos en el software de las respuestas del primer DCC.

En la Tabla 5, se indican los 30 tratamientos generados con sus respectivos resultados de aceite crudo extraído.

El programa estadístico STATGRAPHICS[®] determinó la siguiente ecuación cuyo coeficiente de correlación fue 74,93%, mayor al obtenido en el primer DCC:

$$Y = -86,9408 + 3,0779T - 0,0521M + 0,6371E + 39,914P - 0,0292T^2 + 0,0038TM + 0,0178TE - 0,2912TP - 0,00075M^2 - 0,0178ME - 0,0660MP + 0,3646E^2 - 2,8638EP - 12,6891P^2$$

En donde Y es la respuesta (aceite en gramos), temperatura (T), tiempo (M), enzima (E %) del PPM y P es proporción agua:materia prima.

La Figura 1 presenta tres diagramas de superficies de respuesta (A, B y C) obtenidas

Tabla 4.- Variables y sus niveles para el segundo diseño compuesto central (DCC)

Variable	Símbolo	Niveles de variables codificadas (X_i)				
		-2 (- α)	-1	0	1	2 (+ α)
Temperatura °C	X_1	44	48	52	56	60
Tiempo minutos	X_2	30	40	50	60	70
Enzima % del PPM	X_3	1,33	1,77	2,21	2,65	3,09
Proporción H ₂ O:m.p	X_4	0,4:1	0,5:1	0,6:1	0,7:1	0,8:1

PPM: peso de proteína en la muestra = 29,484 g

Tabla 5.- Segundo DCC, resultados de la extracción de aceite (Y_1) y % de aceite extraído

Tratamiento (T)	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (PPM)	X_4 (Agua:m.p.)	Y_1 Respuesta aceite (g)	% aceite extraído
1	44	50	2,21	0,6:1	4,9137	38,30
2	48	60	1,77	0,5:1	5,9482	46,36
3	48	60	2,65	0,5:1	6,3315	49,35
4	48	40	1,77	0,5:1	6,2075	48,38
5	48	40	2,65	0,5:1	7,0523	54,96
6	48	60	1,77	0,7:1	6,0555	47,19
7	48	60	2,65	0,7:1	6,4263	50,08
8	48	40	1,77	0,7:1	6,7308	52,46
9	48	40	2,65	0,7:1	7,3861	57,56
10	52	70	2,21	0,6:1	6,8643	53,50
11	52	50	2,21	0,4:1	6,5997	51,44
12	52	50	2,21	0,8:1	6,3699	49,64
13	52	30	2,21	0,6:1	6,518	50,80
14	52	50	1,33	0,6:1	7,0261	54,76
15	52	50	3,09	0,6:1	7,5233	58,63
16	52	50	2,21	0,6:1	7,3478	57,27
17	52	50	2,21	0,6:1	7,1496	55,72
18	52	50	2,21	0,6:1	7,7781	60,62
19	52	50	2,21	0,6:1	7,3929	57,62
20	52	50	2,21	0,6:1	7,4048	57,71
21	52	50	2,21	0,6:1	7,5573	58,90
22	56	60	1,77	0,5:1	7,2825	56,76
23	56	60	2,65	0,5:1	8,1908	63,84
24	56	40	1,77	0,5:1	6,9935	54,50
25	56	40	2,65	0,5:1	8,3707	65,24
26	56	60	1,77	0,7:1	7,3269	57,10
27	56	60	2,65	0,7:1	7,5435	58,79
28	56	40	1,77	0,7:1	7,4539	58,09
29	56	40	2,65	0,7:1	7,7087	60,08
30	60	50	2,21	0,6:1	5,3383	41,60

PPM: peso de proteína en la muestra = 29,484 g.

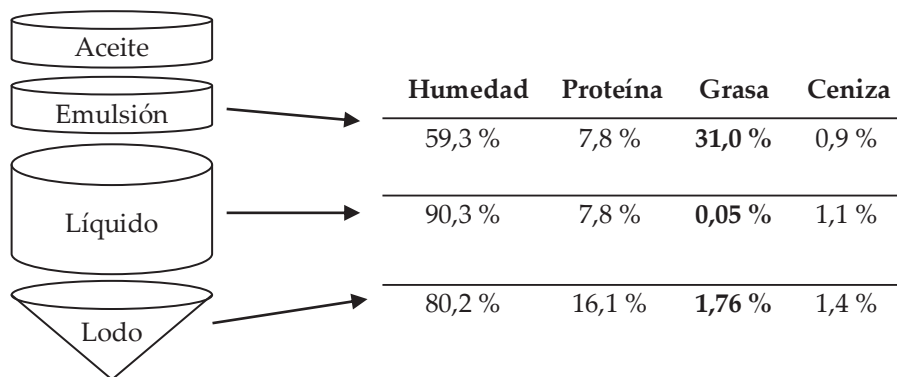


Figura 2.- Composición proximal de cada fase obtenida al centrifugar el hidrolizado enzimático.

del segundo DCC, en A y B la mayor extracción de aceite se encontró cerca al centro del diseño, en C la mayor extracción es con la mayor concentración de enzima en el rango de temperaturas 52 a 54 °C

Finalmente, las condiciones óptimas para extraer mayor cantidad de aceite se muestran en la Tabla 6. La respuesta óptima (8,56 g de aceite \approx 66,7% de aceite extraído) corresponde a la cantidad de aceite (g) que debería obtenerse en este proceso al aplicar estas condiciones al mismo lote y cantidad de materia prima (210 g) que se utilizó para este DCC.

Tabla 6.- Condiciones óptimas para maximizar la extracción de aceite del hidrolizado enzimático

Variable	Unidades	Símbolo	Valor óptimo
Temperatura	°C	X_1	54,15
Tiempo	Minutos	X_2	44,09
Enzima	% del PPM	X_3	3,0
Proporción	Agua:m.p.	X_4	0,49:1

El R^2 obtenido (74,93%) fue mayor que el primer DCC del presente trabajo y similar al encontrado por DUMAY et al. (2006) de 75,2%, quien realizó la extracción de lípidos en cabezas de sardina usando PROTAMEX™.

Etapas II

Tabla 7.- Resultados en cantidad de aceite extraído bajo la condición óptima

Replica	Aceite (g)	Aceite extraído (%)
1	9,14	71,26
2	8,63	67,25
3	8,97	69,90
4	9,00	70,17
Promedio	8,94 \pm 0,22	69,65 \pm 1,70

La extracción de 8,9 g de aceite crudo, correspondió al 69,65 \pm 1,7% de la grasa de residuos de anchoveta (Tabla 7).

La cantidad de aceite que no se logró extraer, quedó retenida en las 3 fases restantes que se forman al centrifugar la

solución hidrolizada. La Figura 2 presenta la composición proximal, la fase emulsión presentó el mayor contenido graso de 31%, en la fase lodo 1,76% indicando que esta cantidad de grasa quedó retenida en la materia prima después de la hidrólisis; y finalmente, en la fase líquida presentó 0,05% de grasa.

La cantidad de aceite extraída fue mayor que cualquiera de los 30 tratamientos desarrollados en el primer y segundo DCC; y que los obtenidos en trabajos desarrollados por otros investigadores, tales como DUMAY et al. (2006) quien realizó la extracción de lípidos de las cabezas de sardina usando PROTAMEX™, (29 min, a 31 ó 32 °C y 0,26 a 0,28% de enzima a pH 8 y a 1:1 agua:mp), obtuvo un 49% de lípidos. BATISTA et al. (2009), logró extraer 40% del contenido graso de un hidrolizado enzimático de residuos de sardina (*Sardina pilchardus*) utilizando PROTAMEX™ (enzima 0,5% del peso de la materia prima, 4 horas de hidrólisis a 50 °C en una proporción agua:materia prima de 1:1) y KHIARI (2010), recuperó un 54,7% y 56,5% del contenido graso proveniente de la cabeza y piel de caballa (*Scomber scombrus*) respectivamente, previo tratamiento de hidrólisis enzimática con ALCALASE® (proporción peso:volumen de 1:3 en solución buffer a pH 8, 0,1 % de enzima (volumen/peso), a 50 °C por 2 horas).

Caracterización del aceite crudo

El contenido de EPA y DHA en la materia prima fue de 28,8% y en el aceite crudo extraído fue de 28,6%, el resto de los ácidos grasos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$); evidenciándose que la hidrólisis enzimática no afectó el perfil de ácidos grasos del contenido graso de la materia prima.

Respecto a las características químicas del aceite crudo se obtuvo un valor de acidez libre de 5,63% de ácido oleico, ligeramente superior al límite señalado por ITINTEC 1985 (Límite = 5%) probablemente debido a la presencia de lipasas presentes en la materia prima. El valor peróxido de 12,7 meq O_2 /kg; según CODEX (1981), un valor menor a 15 meq O_2 /kg de aceite, se considera aceptable. La porción insaponificable fue de 2,3%; el cual reviste interés nutricional debido a que contiene principalmente esteroides, de los cuales destacan el colesterol y vitaminas liposolubles

principalmente A, D y E (AQUERRETEÇA-APESTEGUIA, 2000, citado por BELÉN-CAMACHO et al. 2006). El valor de TBA fue de 0,97 y el valor de anisidina fue de 26,5; indicando que el aceite presentó una leve oxidación.

Entre las características físicas, el aceite extraído presentó un bajo contenido de humedad (0,13%) comparado con un aceite crudo tradicional, peso específico de 0,927 y una densidad de 0,94 kg/m³, aceptable por ITINTEC (1985). Las mediciones de L*=30,07, a*= 11,76 y b* = 20,75 indicaron claridad del aceite representado por L*, con una mayor formación de pigmentos de color rojo (parámetro a*).

CONCLUSIONES

1. Se optimizó la hidrólisis enzimática aplicando un tiempo de 44 min, a 54 °C, dosificación de enzima de 3% del PPM y proporción de agua: mp de 0,5:1. Bajo esta condición óptima de hidrólisis enzimática se logró extraer el 69,65% de la grasa contenida en los residuos frescos de anchoveta, superior a los obtenidos en otros trabajos de investigación con otras especies de interés comercial.
2. Las características físicas y químicas del aceite crudo obtenido fueron: 0,13% de humedad; densidad de 0,937 kg/m³; color L*= 30,07 a*= 11,76 y b*= 20,75; 28,6% de omega 3 (EPA + DHA); acidez libre con 5,63% de ácido oleico; valor peróxido de 12,7 meq O₂/kg de aceite; 2,3% de materia insaponificable; 0,968 de valor TBA y 26,5 de valor de anisidina.
3. La hidrólisis enzimática que aplicó una mayor cantidad de agua y menores niveles de temperatura, tiempo y porcentaje de enzima, logró extraer aceite crudo de un color más claro.
4. El proceso enzimático aplicado no alteró la composición de ácidos grasos. Los niveles de EPA y DHA, se mantuvieron tan igual como en la materia prima.
5. El aceite crudo obtenido presentó un contenido de humedad, densidad y color, mejores a los característicos de un aceite crudo proveniente de una planta de harina. Las características químicas restantes corresponden a un aceite crudo ligeramente oxidado que debe ser refinado para el consumo humano directo.

AGRADECIMIENTO

La autora principal agradece al ITP por el financiamiento, facilidades en el uso de las instalaciones, equipos y el apoyo de los profesionales en la ejecución de este trabajo de investigación, el cual fue presentado como tesis a la UNALM para la obtención del Título de Ingeniero Pesquero.

REFERENCIAS

1. AOAC. 2007. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th edition. Rev. 2. USA.
2. BATISTA I, RAMOS C, MENDONÇA R, NUNES M. 2009. Enzymatic Hydrolysis of Sardine (*Sardina pilchardus*) By-products and Lipid Recovery. Journal of Aquatic Food Product Technology, 18. 120-134p.
3. BELÉN-CAMACHO D, GARCÍA D, MORENO-ÁLVAREZ M, MEDINA C, GRANADOS Á. 2006. Composición proximal, ácidos grasos y características fisicoquímicas de aceite de harina artesanal de caribe (*Serrasalmus rhombeus* Pisces: Characidae) proveniente de Caicara del Orinoco-Venezuela. Grasas y aceites, 57 (4). Octubre-Diciembre. 382-386p.
4. BLIGH E, DYER W. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology Vol 37.
5. CANDELA J. 1990. Estudio cinético del hidrolizado enzimático de *Merluccius gayi peruanus* (merluza) empleando enzima proteolítica Bromelina. Tesis Ing. Pesquero, UNFV, Lima.
6. CODEX STAN 19. 1981. Norma para grasas y aceites comestibles.
7. DÁVILA S. 1972. Hidrólisis y valoración cromatográfica de metionina y cistina en Merluza. Tesis Ing. Pesquero, UNFV, Lima.
8. DOUE. 2008. Reglamento (CE) N° 1022/2008 de la comisión de 17 de octubre de 2008. valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT). L 277. 20p.
9. DUMAY J, BARTHOMEUF C, BERGE J. 2004. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 13(2).
10. DUMAY J, DONNAY-MORENO C, BARNATHAN G, JAOUEN P, BERGE JP. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. Process Biochemistry 41. 2327-2332 p.
11. FAO. 1971. La producción de harina y aceite de pescado. FAO Fish, Tech. Paper. 42-54p.
12. FAO. 1986. The production of fish meal and oil. Technical paper, 142.

13. FAO. 1986. Food and Nutrition Paper. T 14/7. Food Analysis: General Techniques, Additives, contaminants and composition.
14. IMARPE/ITP. 1996. Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú. Instituto del mar del Perú (IMARPE) – Instituto tecnológico pesquero del Perú (ITP). Editorial Stella. Lima.
15. INSTITUTO TECNOLÓGICO PESQUERO. 2004. La Anchoveta Peruana: Oportunidad para la industria conservera nacional. Gráfica Biblos S.A. Callao.
16. KHIARI Z. 2010. Functional and bioactive components from mackerel (*Scomber scombrus*) and blue whiting (*Micromesistius poutassou*) processing waste. Tesis doctoral, Dublin Institute of Technology.
17. MONTGOMERY D. 2002. Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda edición. Editorial Limusa, S.A. México, D.F.
18. PARK W. 2000. Surimi and Surimi Seafood. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. 381-382p.
19. PRODUCE. 2012. Anuario estadístico. Lima.