

Extracción y caracterización del aceite crudo obtenido de un hidrolizado enzimático de residuos frescos de anchoveta (*Engraulis ringens*)

Extraction and characterization of crude oil recovered from anchovy (*Engraulis ringens*) solid wastes enzymatic hydrolysis

¹* Tito Eduardo Llerena Daza y ²Diana Milagros Aranda Pariasca

Resumen

Los residuos frescos de la anchoveta (*Engraulis ringens*) provenientes del procesado para consumo humano directo fue la materia prima para obtener un hidrolizado enzimático que facilite la posterior extracción de aceite crudo. El estudio se realizó en dos etapas. La primera consistió en encontrar las condiciones más favorables para el proceso de hidrólisis enzimática aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR), para ello se seleccionaron cuatro variables independientes: temperatura, tiempo de hidrólisis, dosificación de la enzima Protamex™ y proporción agua : materia prima, obteniéndose 30 combinaciones experimentales; y se evaluaron las variables dependientes: cantidad de aceite extraído y color, con ayuda del programa estadístico Statgraphics®. En la segunda etapa se determinó el porcentaje de aceite crudo extraído y sus características físicas y químicas: perfil de ácidos grasos, valor de TBA, acidez libre, materia insaponificable, valor de anisidina, valor peróxido, humedad y materia volátil, densidad, peso específico y color en L*a*b*. En la primera etapa, y de acuerdo a los modelos matemáticos hallados, se determinó que para obtener la mayor cantidad de aceite crudo, los niveles de temperatura, tiempo de hidrólisis, dosificación de la enzima y proporción de agua: materia prima necesario fueron de 54,15 °C, 44,1 min, 3% del peso de proteína presente en la muestra (PPM) y 0,5: 1 respectivamente. En la segunda etapa el porcentaje de aceite crudo extraído fue 69,7± 1,7% del contenido graso total, en el perfil de ácidos grasos se obtuvo valores promedio de 28,6% de omega 3 (EPA + DHA) y se determinó la acidez libre (5,63% como ácido oleico), valor peróxido (12,7 meq O₂/kg), materia insaponificable (2,3%), TBA (0,968 mg MA/kg), valor de anisidina (26,5), humedad (0,13%), densidad (0,927 g/cm³), peso específico (0,937) y en color los valores fueron L* (30,07); a*(11,76) y b*(20,75) respectivamente.

Palabras clave: anchoveta, enzima, residuos, aceite, superficie de respuesta, sistema CIELAB.

Abstrac

The fresh anchovy (*Engraulis ringens*) wastes coming from processing operations for direct human consumption was the raw material to obtain an enzymatic hydrolysate that facilitates the subsequent extraction of crude oil. The study was carried out in two stages. The first consisted of finding the most favorable conditions for the enzymatic hydrolysis process, applying the response surface methodology (MSR), for it were selected four independent variables: temperature, time of hydrolysis, dosage of the enzyme Protamex™ and proportion water: raw material, obtaining 30 experimental combinations; in the dependent variables were evaluated: quantity of extracted oil and color, with the help of the statistical program Statgraphics®. In the second stage the percentage of crude oil extracted and its physical and chemical characteristics were determined: profile of fatty acids, TBA value, free fatty acids, unsaponifiable matter, anisidine value, peroxide value, moisture and volatile matter, density, specific gravity and color in L*a*b*. In the first stage, and according to the mathematical found models, it was determined that in order to obtain the highest amount of crude oil, the levels of temperature, hydrolysis time, enzyme dosage and water proportion: required raw material were 54,15 °C; 44,1 min; 3% of the protein weight present in the sample (PPM) and 0,5: 1; respectively. In the second stage the percentage of crude oil extracted was 69,7 ± 1,7% of the total fat content. In the fatty acid profile had obtained mean values of 28,6% of omega 3 (EPA + DHA); acid value (5,63% as oleic), peroxide value (12,7 MEq.O₂/kg), unsaponifiable matter (2,3%), TBA value (0,968 mg MA/kg), anisidine value (26,5), moisture (0,13%), density (0,927 g/cm³), specific gravity (0,937) and color coordinates from CIELAB space were L*(30,07), a* (11,76) and b* (20,75).

Key words: anchovy, enzyme, fish waste, oil, response surface, CIELAB system.

¹Departamento Académico de Acuicultura e Industria Pesquera, Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado postal 12-056 - La Molina, Lima, Perú. Email: telld@lamolina.edu.pe.

*Autor de correspondencia.

²Egresada de la Facultad de Pesquería. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

1. Introducción

Los residuos de la anchoveta, destinadas al consumo humano directo, presentan buenas condiciones de calidad y niveles relativamente bajos de productos de degradación (trimetilamina, aminos biogénicas, péptidos, etc.) puesto que mantienen la cadena de frío desde su captura (Khiari, 2010). Esta cualidad, al poder ser aprovechada, ha motivado el desarrollo de varios estudios bajo la aplicación de procesamientos menos agresivos afin de obtener diversos productos (Albrecht-Ruiz, 2008).

Por otro lado, la aplicación de enzimas en procesos en el sector alimentario es de gran interés debido principalmente a su especificidad y gran velocidad de sus reacciones (Dumay *et al.*, 2004; Candela, 1990). Dicha especificidad es la razón por la cual se selecciona una enzima en aplicaciones industriales concretas con el fin de mejorar el proceso, las propiedades de la materia prima y del producto (Wiseman, 1991).

En estas condiciones, el presente trabajo de investigación busca aplicar un procesamiento menos agresivo que el método de extracción por presión húmeda que no conserva sus propiedades biológicas que tenía cuando se encontraba en su forma original, que incluye el pretratamiento del uso de enzimas proteolíticas, con la finalidad de liberar aceite crudo a partir de los residuos frescos de anchoveta, (FAO, 1997).

2. Materiales y métodos

Materia prima

La materia prima fueron los residuos que constan de cabezas, vísceras y colas de un lote de aproximadamente 50kg de anchoveta fresca entera, proveniente de la línea de conservas de la planta piloto del Instituto Tecnológico Pesquero. Este recurso, desde la captura en Pisco-Ica hasta el proceso fue conservado en agua con hielo por un tiempo no mayor a 10 horas.

Material enzimático

La enzima utilizada fue ProtamexTM (E.C. 3.4.21.2/3.4.24.28) endoproteasa que produce un mayor porcentaje de hidrólisis frente a otras enzimas comerciales (Aspmo, 2005), con un rango óptimo entre pH 5,5 y 7,5 (Ramírez, 2006).

Métodos analíticos

De la materia prima:

Los residuos de la anchoveta fueron sometidos a los análisis de humedad, proteína, grasa cruda y cenizas ejecutados según FAO (1986), y el nitrógeno de bases volátiles total según el método de Lücke y Geidel, modificado por Antonacopoulos (1960).

Del aceite crudo extraído, extracción y caracterización:

Se siguió la metodología de extracción de lípidos totales de Bligh and Dyer (1959). La muestra de aceite se caracterizó por materia insaponificable (NTP 209-057. ITINTEC, 1980), humedad y material volátil (NTP 209-004. ITINTEC, 1968), densidad (AOAC, 1990), peso

específico (AOAC, 1984), acidez en porcentaje de ácido oleico (AOCS, 2005), valor peróxido (AOAC, 2005), valor de TBA (AOCS, 2005) y valor de anisidina (NTP 209-217 ITINTEC, 1983).

Para la medida del color del aceite se utilizó un colorímetro (Nippon Denshoku, modelo ZE2000), y se determinó los valores cromáticos de L*(blancura), a*(proporción rojo/verde) y b*(proporción amarillo/azul) según el método CIE Lab de 1976.

La composición en ácidos grasos por cromatografía de gases se ejecutó de acuerdo a la metodología implementada en Lab-ITP (1998).

El control del pH de la hidrólisis enzimática fue realizado por medición directa con equipo Mettler Toledo Modelo Seven easy, según el método de Lab-ITP, (2003).

Procesamiento para obtener aceite crudo del hidrolizado enzimático

Para obtener el aceite crudo, se partió de las cabezas, vísceras y colas provenientes de la operación del fileteado de la anchoveta, para la presentación HGT (Head, Gut, Tail) o tipo tubo sin cabeza, vísceras y cola. Estas fueron vertidas en un contenedor para realizar la operación de mezcla de los residuos, con el uso de una pala. Luego, se envasó 200±1g de materia prima en bolsas de polietileno de alta densidad, selladas herméticamente y congeladas a -25 °C en espera a la realización de los experimentos. La descongelación se realizó en corriente de agua a una temperatura determinada y en función a la temperatura del tratamiento al que iba ser expuesto. El tiempo de descongelado no fue mayor a 15 min. Las condiciones de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en función a la información técnica de la enzima utilizada (ProtamexTM) y se establecieron determinados factores de estudio tales como temperatura, tiempo, porcentaje de enzima y proporción de agua: materia prima. La temperatura del sistema (X_1) fue estabilizada con un baño de agua de flujo continuo; 200±1g de materia prima fue vertida a un recipiente al cual se le adicionó una cantidad de agua destilada (X_4) y una cantidad de enzima (X_3) fue agregada cuando el sistema alcanzó la temperatura de trabajo. La hidrólisis fue por un tiempo determinado (X_2) y expuesta a una agitación de 60 r.p.m.

Al finalizar la hidrólisis, se inactivó la enzima presente por calentamiento a 85 °C por 10 min en baño maría. Inmediatamente, todo el hidrolizado enzimático fue centrifugado a 2000 rpm por 15 min; posteriormente el aceite fue separado, vertido en tubos de vidrio, pesado, cerrado en gas totalmente inerte (N_2) para evitar la oxidación de las grasas y almacenado en congelación a -25 °C, para finalmente ser sometido a los análisis correspondientes.

Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Para optimizar el proceso de hidrólisis enzimática, se utilizó la metodología de superficie de respuesta la cual propone una experimentación factorial; es decir, que todos los factores en estudio varían simultáneamente.

Asimismo, se aplicó un diseño compuesto central que permitió el estudio de un modelo cuadrático con un valor de α igual a 2. El tratamiento de los resultados se realizó mediante el análisis de regresión múltiple y el análisis de varianza (Montgomery, 2004). El presente estudio utilizó el programa estadístico Statgraphics® Plus 5,1 para el procesamiento de datos en la optimización.

Diseño experimental

Primera etapa

Se seleccionó la temperatura, el tiempo, el porcentaje de enzima, y la proporción de agua: materia prima, como los cuatro factores más relevantes en la hidrólisis enzimática, para la optimización en la extracción de aceite crudo y la obtención de un color más claro, para ser evaluado por separado (Dumay *et al.*, 2009).

La Tabla 1 resume toda la información necesaria para elaborar el diseño compuesto central (DCC) para la optimización. Cada factor tomó un total de cinco niveles diferentes en el diseño que permitió cubrir el rango de trabajo favorable para la enzima Protamex™. Esto dio un total de 30 tratamientos, a partir de los cuales se estudiaron las respuestas (1) la extracción de aceite crudo y (2) su color obtenido. Se eligió para el diseño un valor práctico $\alpha = 2$ (Myers y Montgomery, 1995).

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

Variables	Símbolo	Niveles de variables codificadas (X_j)					
		-2 (- α)	-1	0	1	2 (+ α)	
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	Agua : materia prima	X_4 : 1	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)

Optimización en la extracción de aceite crudo

La extracción de aceite crudo se efectuó después de centrifugar la muestra hidrolizada de cada tratamiento. El aceite fue cuantificado por gravimetría expresada en gramos y con éste valor se calculó el porcentaje de aceite crudo con respecto al contenido graso total de la materia prima utilizando la siguiente ecuación.

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

Para optimizar una máxima extracción de aceite, se ingresaron los 30 resultados de aceite en g, al programa estadístico Statgraphics®; obteniéndose los niveles de las cuatro variables estudiadas. Además, se obtuvo la ecuación matemática con su coeficiente de determinación.

Optimización en el color de aceite más claro

La determinación del color se realizó de acuerdo al método descrito anteriormente. Primero, se consideró tomar un volumen de aceite constante de cada tratamiento y se le agregó un volumen constante de solvente (hexano) que sumados alcanzan un volumen mínimo de 10 ml, el cual es requerido por el colorímetro. En el primer DCC, se agregaron 8 ml de hexano a 3,2 ml de aceite para cada uno de los 30 tratamientos, se agitó cada tubo y fue medido utilizando los parámetros $L^*a^*b^*$ aplicando la fórmula de blancura (*whiteness*) señalada por Park (2000) correspondiente a

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

Al igual que la optimización de la extracción de aceite crudo, se ingresaron los 30 resultados de color al programa estadístico Statgraphics®; obteniéndose así los niveles de las cuatro variables estudiadas, además de la ecuación matemática con su coeficiente de determinación.

Segunda etapa

En la segunda etapa se aplicaron las condiciones óptimas halladas en la primera etapa y se determinó:

Porcentaje de aceite crudo extraído: la solución hidrolizada después de ser centrifugada generó la formación de las fases acuosa (emulsión, líquido y lodo) y aceitosa. Esta fue cuantificada para determinar el porcentaje de aceite crudo extraído respecto al contenido graso total de la materia prima. Los componentes de la fase acuosa fueron separados y se le determinó, a cada una de ellas, su porcentaje de grasa; para ello se utilizó el método de extracción Soxhlet.

Caracterización del aceite crudo: el aceite obtenido fue caracterizado según los métodos analíticos físicos y químicos descrito anteriormente. Finalmente, estos resultados de extracción y caracterización fueron comparados con los encontrados en la bibliografía respecto a procesamiento de aceite de pescado.

3. Resultados y discusión

Primera etapa

La composición física porcentual de los constituyentes provenientes del corte HGT, obtenida en una planta que procesa anchoveta para conservas, muestra que la cabeza (26,1%), vísceras (19,3%) y cola (1,6%), representan un rendimiento de 47% respecto al pescado entero. Estos resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición física y rendimiento de la anchoveta (*Engraulis ringens*)

Presentación y/o corte	HGT	Cabeza	Visceras	Cola	Cabeza, vísceras y cola
Porcentaje*	53,0 ± 1,9	26,1 ± 1,3	19,3 ± 1,6	1,6 ± 0,3	47,0 ± 1,9

(*) Promedio ± desviación estándar de 34 especímenes en el intervalo de 14,0 a 14,9 de Longitud Total

La Tabla 3 muestra la composición química proximal de cada recorte por separado y de la materia prima que consta de la mezcla de estos tres cortes. Respecto al contenido proteico, fue necesario determinarlo para conocer la cantidad de enzima Protamex™ a dosificar. En cuanto al contenido de grasa, se observó que tanto la cabeza como las vísceras de anchoveta son ricas en grasa, componente potencialmente interesante por el alto contenido de ácidos grasos omega 3 en este recurso (Salas *et al.*, 2003; Huss, 1998).

Tabla 3. Composición proximal para la cabeza, vísceras, cola y materia prima proveniente de la anchoveta (*Engraulis ringens*)

	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Ceniza %
Cabeza	76,52 ± 0,01	13,17 ± 0,14	5,00 ± 0,04	4,98 ± 0,04
Visceras	76,20 ± 0,06	15,34 ± 0,14	6,11 ± 0,01	2,23 ± 0,02
Cola	72,03 ± 0,02	15,32 ± 0,14	3,97 ± 0,02	8,33 ± 0,01
Materia Prima	76,84 ± 0,02	14,03 ± 0,23	4,95 ± 0,03	4,15 ± 0,02

Promedio ± desviación estándar

Optimización en la extracción de aceite crudo

La metodología usada generó los 30 tratamientos que se detallan en la tabla 4. Posteriormente, cada uno fue desarrollado en el laboratorio, obteniéndose los resultados correspondientes de aceite extraído en g. De manera general, en el primer DCC se observó que a una menor dosificación de enzima (2% PPM), a 40 °C, a un mayor tiempo de 150 min y a una proporción de agua: materia prima de 1,6:1, produjo menor obtención de aceite. Mientras que a una mayor dosificación de enzima (3,6% PPM) por de 70 min, a 50 °C y una proporción de agua: materia prima 0,8:1 se obtuvo mayor cantidad de aceite crudo.

Todos los resultados de aceite en g fueron ingresados al programa estadístico Statgraphics® para conocer los niveles óptimos de cada variable que ofrezca la mayor extracción de aceite (Tabla 4); así mismo, para obtener la ecuación matemática que representa a esta función, la cual se presenta a continuación y cuyo coeficiente de determinación fue 63,3%.

$$Y = 10,2045 - 0,269691T + 0,013537M + 1,0643E - 4,66789P + 0,00328425T^2 - 0,000278688TM - 0,0142475TE + 0,049875TP - 0,0000901445M^2 + 0,00241156ME + 0,0061625MP - 0,164444E^2 + 0,320437EP + 0,177148P^2$$

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

La condición óptima de hidrólisis para obtener y maximizar la extracción de aceite, del primer diseño compuesto central, fue hallada por el programa estadístico y corresponde a 55 °C, por 50 min, enzima 2,3% PPM y proporción de agua: materia prima de 0,6:1. Al aplicar estas condiciones óptimas se obtuvo 4,45 g de aceite que correspondió a un 45% de aceite extraído con un coeficiente de variación de 6,2%; cercano a la respuesta óptima predicha (4,57 g) por el programa estadístico.

Optimización en el color de aceite más claro

En el presente estudio, la utilización de la fórmula de “whiteness” permitió la interacción de los 3 parámetros (L*a*b*) para definir el color, y así se pudo observar una relación entre los tratamientos y el resultado de color obtenido.

Las medidas de color de los 30 tratamientos que se detallan en la Tabla 5 fueron ingresados al programa estadístico Statgraphics® para predecir la respuesta (color obtenido) en función de las variables estudiadas, quedando representada en la siguiente ecuación matemática que presenta un R² de 88,61%.

$$Y = 65,6637 + 1,89161T + 0,33948M - 6,95693E - 55,4301P - 0,0298625T^2 - 0,0119719TM - 0,076125TE + 0,764063TP + 0,000636523M^2 - 0,0251094ME + 0,0238672MP + 2,04594E^2 - 1,68594EP + 12,4668P^2$$

La ecuación de color que presentó un coeficiente de determinación (R²) mayor (88,6%), con respecto a la ecuación extracción de aceite con un R² menor (64,3%), significa que la variabilidad obtenida en las variables respuesta puede ser correctamente explicada mediante el modelo de regresión de la ecuación de color del aceite y puede ser utilizada para realizar predicciones del proceso y optimiza los parámetros de operación (Montgomery, 2004; Dumay *et al.*, 2009).

La condición óptima de hidrólisis para obtener un color de aceite más claro hallada por el programa estadístico, corresponde a una temperatura de 40,7 °C, tiempo de 62,7 min, enzima de 1,0 % PPM y proporción de agua: materia prima de 2:1.

Los resultados de color del aceite mostraron que al aplicar menores niveles de temperatura, tiempo y porcentaje de enzima y mayor cantidad de agua en el proceso de hidrólisis enzimática, se logró obtener un color más claro del aceite.

Tabla 4. Resultados en extracción de aceite y % de aceite extruido de los 30 tratamientos del primer diseño compuesto central

Tratamiento (T)	X ₁ °C	X ₂ min	X ₃ % de PPM	X ₄ H ₂ O:MP	X ₅ Respuesta aceite (g)	% de 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	3,1410	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	3,1260	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

Los tratamientos sombreados corresponden a las 6 repeticiones del punto central

Condición óptima para la extracción de aceite crudo del hidrolizado enzimático (2^{do} DCC)

Debido a la baja correlación (64,3%) del primer DCC a las condiciones óptimas, se presentó niveles extremos en los factores de temperatura y proporción de agua: materia prima. Y con el fin de centrar mejor el diseño, se desarrolló un segundo DCC.

Se trabajó con un nuevo lote de materia prima, el cual nuevamente presentó un contenido de proteína de 14%, siendo diferente el contenido graso de 6,1% (mayor que el reportado en el primer lote 4,95%). El valor de 17,9 N de BVN/100g de materia prima correspondió a un pescado fresco y el valor de pH de 6,39 se encontró dentro del rango óptimo de trabajo de la enzima (Diario Oficial de la Unión Europea, 2008).

Nuevamente se reprogramó los niveles para cada variable tal como se indica en la Tabla 6, en donde el nuevo punto central fue establecido basándonos en los valores óptimos del primer diseño compuesto central.

Tabla 5. Resultados de blancura para los 30 tratamientos del primer diseño compuesto central

Tratamiento (T)	Color			Y ₂ Blancura
	L*	a*	b*	
1	77,68	-0,42	36,68	57,06
2	85,49	-2,01	40,88	56,57
3	75,76	0,92	37,77	55,11
4	69,03	0,66	34,67	53,51
5	78,82	0,95	40,44	54,34
6	79,25	-1,03	33,19	60,84
7	80,79	-0,58	37,23	58,10
8	90,28	-2,57	35,95	62,67
9	87,51	-0,28	46,93	51,44
10	77,35	-0,92	38,42	55,39
11	65,53	5,68	50,85	38,31
12	88,22	-1,25	35,62	62,46
13	43,72	0,78	22,29	39,46
14	70,88	1,49	42,85	48,17
15	71,52	1,81	36,91	53,34
16	52,97	1,78	30,61	43,86
17	50,34	0,67	24,77	44,50
18	60,67	2,35	35,25	47,13
19	61,78	1,42	39,21	45,23
20	58,95	2,85	33,95	46,65
21	53,98	1,01	35,68	41,76
22	64,28	0,98	39,7	46,59
23	47,46	5,56	41,47	32,84
24	59,96	1,21	30,44	49,69
25	34,33	3,26	31,11	27,26
26	70,7	0,39	33,44	55,54
27	67,85	2,15	41,1	47,77
28	68,77	0,97	39,03	50,00
29	71,22	4,23	51,29	41,04
30	66,11	12,11	68,61	22,52

L* = claridad (“0” negro a “100” blanco), a* = (“+” rojo a “-” verde), b* = (“+” amarillo a “-” azul)

Tabla 6. Variables y sus niveles para el segundo diseño compuesto central

Variables	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	Agua : materia prima	X ₄ :1	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 α = 2 (Corresponde a un DCC rotable)

Los 30 tratamientos resultantes (5 primeras columnas) se indican en la Tabla 7 con su correspondiente respuesta en g de aceite (6 columnas). Con estos resultados el programa estadístico Statgraphics® determinó la siguiente ecuación matemática que corresponde al proceso estudiado con un R² de 74.9%.

$$Y = -86,9408 + 3,07791T - 0,0521301M + 0,637192E + 39,914P - 0,0291619T^2 + 0,00380016TM + 0,0178516TE - 0,291203TP - 0,000753031M^2 - 0,0177997ME - 0,0660187MP + 0,364589E^2 - 2,86378EP - 12,6891P^2$$

La Figura 1 presenta una superficie de respuesta en forma acampanada, se puede observar claramente que la mayor extracción de aceite se presentó cerca del centro, con valores de 52 °C y 50 min respectivamente. Así mismo, la mínima extracción se ubicó a menor temperatura (48 °C) por más tiempo (60 min).

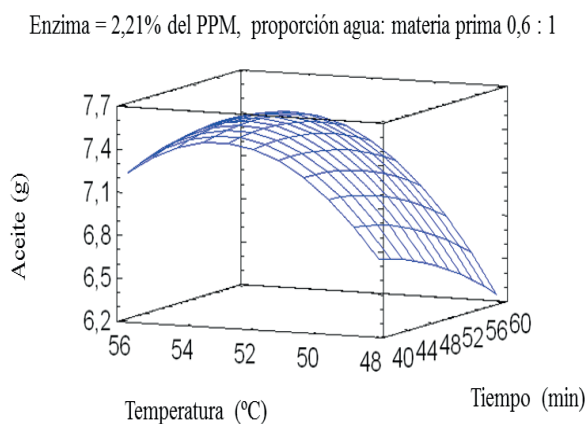


Figura 1. Superficie de respuesta que relaciona temperatura y tiempo con la extracción de aceite (2^{do} DCC).

Finalmente, las condiciones óptimas para la operación de hidrólisis enzimática, que ayuden a extraer la mayor cantidad de aceite, fue obtenida por el programa estadístico que utilizó los resultados de la Tabla 7 y se encuentran detallados en la Tabla 8. La respuesta óptima (8,5635 g de aceite) corresponde a la cantidad de aceite en 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 segundo DCC.

Respecto al R² obtenido en el segundo DCC (74,9%), resultó mayor que el primero (64,3%), mostrando una mayor correlación de los datos, similar al reportado por Dumay *et al.*, (2006) de 75,2%, quien investigó la extracción de lípidos en cabezas de sardina usando ProtamexTM, presentado un R² de 75,2%; siendo la condición óptima para la extracción de lípidos y fosfolípidos de un tiempo de hidrólisis de 29 min, a 31 ó 32 °C; 0,26 a 0,28% de enzima, a pH 8 y a 1:1 volumen de agua: materia prima.

Tabla 7. Resultados en extracción de aceite de los 30 tratamientos del segundo diseño compuesto central.

Tratamiento (T)	X ₁ °C	X ₂ min	X ₃ % de PPM	X ₄ H ₂ O:MP	X _i Respuesta aceite (g)	% de aceite crudo 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	6,5180	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

Tabla 8. Condiciones óptimas para maximizar la extracción de aceite del hidrolizado enzimático

Variable	Símbolo	Valor óptimo
Temperatura °C	X ₁	54,15
Tiempo minutos	X ₂	44,09
Enzima % del PPM	X ₃	3,0
Proporción agua: materia prima	X ₄ :1	0,49:1

Respuesta óptima: 8,56 g de aceite, corresponde a un 66,7 % del aceite extraído R²: 74,93 %

Segunda etapa

Rendimiento del aceite crudo

El aceite fue cuantificado y evidenció que el proceso desarrollado logró extraer en el rango de 67,25 a 71,26 % de la grasa de residuos frescos de anchoveta, con una desviación de 1,7% de 4 repeticiones y un C.V. de 2,4% cuyo valor no es superior al 10 por 100 lo que indica la muestra es homogénea y que el error de muestreo no es elevado (Moya, 1991).

Respecto al resultado promedio obtenido de extracción de aceite (8,9363 g), se observó que fue mayor a cualquiera

de los 30 tratamientos desarrollados para el segundo diseño compuesto central; así mismo, el porcentaje de extracción mejoró de 45% (1^{er} DCC) a 69,7% (2^{do} DCC), esto debido a que el segundo DCC estuvo mejor ubicado en la región del óptimo; además éste resultado proveniente de 210 g de materia prima corresponde a un rendimiento de 4,26 g de aceite/100g de materia prima. Este valor se ubica dentro del rango de rendimiento en aceite de pescado de 2 a 5% presentado por IMARPE/ITP (1996).

La cantidad de aceite que no se logró extraer quedó retenida en la fase acuosa, que luego de separar por diferencia de densidad se obtuvieron 3,1g de emulsión, 61,6g de líquido y 24,6g lodo por 100g del hidrolizado enzimático. El análisis proximal permitió conocer su distribución porcentual que se presenta en la Figura 2. Aquí podemos observar que hay mayor contenido de

grasa en la fase emulsión con 3,1g/100 g, que representa el 9,2 por ciento respecto a la fase aceite; luego en la fase lodo con 1,76% y, finalmente, en la fase líquida presentó 0,05% de grasa, indicando que casi el 2% de la grasa quedó retenida en la materia prima después de la hidrólisis.

Caracterización del aceite crudo

No existieron diferencias significativas entre el porcentaje de ácidos grasos del aceite proveniente de la materia prima y el aceite crudo proveniente de la hidrólisis enzimática ($p > 0,05$); evidenciándose que el tratamiento enzimático no afectó significativamente el perfil del contenido de ácidos grasos de la materia prima. Así mismo, el contenido de EPA y DHA en la materia prima obtuvo un promedio de 28,8% y en el aceite crudo extraído fue de 28,6%.

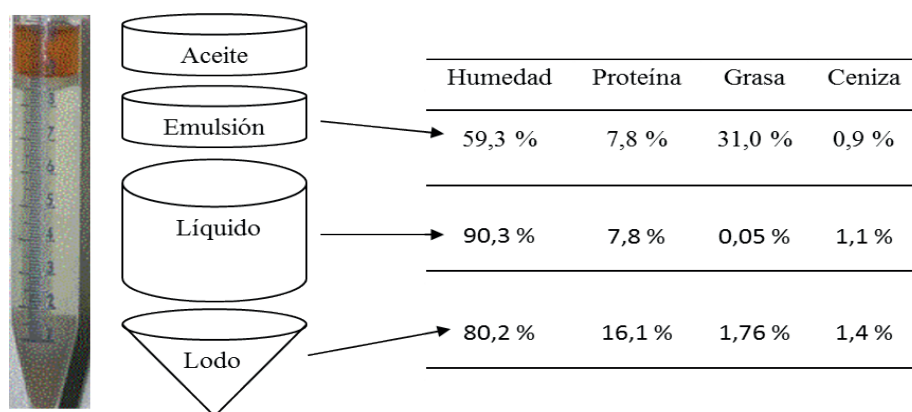


Figura 2. Composición química para cada fase producida al centrifugar el hidrolizado enzimático

Respecto a las características químicas se obtuvo un valor de acidez libre de 5,63% como ácido oleico que se ubicó por encima del límite señalado por NTP ITINTEC (1985) en características técnicas del aceite crudo de pescado (5%), probablemente debido a la presencia de lipasas presentes en la materia prima. El valor peróxido fue de 12,7 meq O₂/kg, pero no es mencionado en dichos estándares; sin embargo, el CODEX (1981) para un valor peróxido menor a 15 meq O₂/kg de aceite considera un rango aceptable para aceites crudos. La porción insaponificable fue de 2,3%; la cual reviste un interés nutricional debido a que contiene principalmente esteroides de los cuales destacan el colesterol y vitaminas liposolubles, principalmente A, D y E (Aquerretca-Apesteguía, 2000 citado por Belén-Camacho *et al.*, 2006). El valor TBA fue de 0,969 mg MA/kg y el valor de anisidina fue de 26,5, los cuales indican que el aceite presentó un leve deterioro.

Entre las características físicas, el aceite extraído presentó un bajo contenido de humedad (0,13%) comparado con un aceite crudo tradicional; la densidad (0,927 kg/m³) y el peso específico (0,937) fueron aceptables (ITINTEC, 1985). Las mediciones de L* =30,07, a*

=11,76 y b* =20,75 indicaron presencia de claridad del aceite, representado por L, con una mayor formación de pigmentos de color rojo (+a*) lo cual es indicativo de oscurecimiento del aceite. En cuanto el valor +b*, éste indicó presencia de coloración amarilla.

4. Conclusiones

A través de la metodología de superficie de respuesta se pudo optimizar el proceso de hidrólisis enzimática que ayudó a la posterior extracción de aceite crudo, aplicando un tiempo de 44 min, a 54 °C, dosificación de Protamex™ de 3% de PPM y proporción agua: materia prima de 0,5:1,0. Bajo esta condición óptima de hidrólisis enzimática se logró extraer el 69,7% de la grasa contenida en los residuos frescos de anchoveta. Las características físicas y químicas del aceite crudo obtenido son adecuadas y concordantes con la literatura revisada. 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. El proceso aplicado para extraer aceite no alteró la composición de los ácidos grasos. Se

obtuvieron buenos niveles de EPA y DHA, tan igual como la composición inicial de los ácidos grasos de la materia prima. El aceite crudo obtenido presentó un contenido de humedad, densidad y color, mejores a las características de un aceite crudo proveniente de una planta de harina. Las características químicas restantes corresponden a un aceite crudo ligeramente oxidado que ha de ser refinado para el consumo humano directo. El aceite crudo, que se logró extraer del hidrolizado enzimático con Protamex™, obtuvo un buen rendimiento (69,7 %), en comparación a otros trabajos de investigación con otras especies de interés comercial debido principalmente a que el proceso de hidrólisis enzimática fue optimizada.

5. Literatura citada

- Albrecht-Ruiz, M. 2008.** Entrevista personal, 28 de Abril.
- Antonacopoulos, N. 1960.** Improved apparatus for quantitative distillation of steam volatile substances. *Lensmittel untersach. U. Forsch.*, 113, 113-160.
- Aspmo, S. 2005.** Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 1957-1966.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC).** 1984. Official Methods of Analysis of AOAC. 14 Ed. Washington. U.S.A.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC).** 1990. Official Methods of Analysis, 14a ed. Arlington, VA. Editorial Williams, S.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC).** 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed. Maryland, USA.
- American Oil Chemists' Society (AOCS). 2005.** Sampling and Analysis of commercial fats and oils. American Oil. Champagne- IL, USA.
- Belén-Camacho, D. R., García, D., Moreno-Álvarez, M. J., Medina, C. y Granados A. 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), 382-386.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Candela, D. J.E. 1990.** Estudio Cinético del Hidrolizado Enzimático de *Merluccius gayi peruanus* (Merluza) empleando enzima proteolítica Bromelina (Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero) Universidad Nacional Federico Villarreal UNFV). Lima, Perú.
- Codex Alimentarius.** 1981. Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. *Codex stan 19-1981, rev 2-1999.* Roma, Italia.
- Dumay, J. L.; Barthomeuf, C. and Berge J-P. 2004.** How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: Enhancement of fat Extraction. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2), 69-82.
- Dumay, J.; Donnay-Moreno, C.; Barnathan, G.; Jaouen, P. and Bergé, J-P. 2006.** Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41 (11), 1-16.
- Dumay, J., Allery, M., Donnay, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Carbonneau, M. & Pascal, J. 2009.** Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1599-1606.
- FAO. 1986.** Manual of food quality control 7. Food analysis: General techniques, additives, contaminants and composition. FAO: Food and Nutrition Paper 14/7. Roma, Italia.
- FAO. 1997.** Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta FAO/OMS (Estudio FAO Alimentación y nutrición 57).
- Huss, H. H. 1998.** El pescado fresco, su calidad y cambios de calidad. FAO: Programa de Capacitación FAO/DANIDA en tecnología y control de calidad. Roma, Italia.
- Instituto del Mar del Perú (IMARPE); Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). 1996.** Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú. Lima, Perú.
- Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). 1998.** Informe de Validación: Cromatografía de ácidos grasos. FQ-002-98. Lima, Perú.
- Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). 2007.** Manual de ensayos del laboratorio físico químico. Lima, Perú.
- Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). 2003.** Manual del Laboratorio LABS-ITP-FQ-001-98. Lima, Perú.
- Khiari, Z. 2010.** Functional and bioactive components from mackerel (*Scomber scombrus*) and blue whiting (*Micromesistius poutassou*) processing waste (Tesis para optar el título de Doctor). Dublin Institute of Technology (DIT). Dublín, Irlanda.
- Myers, R.H. and D.C. Montgomery. 1995.** Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. New York: John Wiley & Sons.
- Montgomery, D. C. 2004.** Diseño y Análisis de Experimentos. 2a. ed. Editorial Limusa, México, D.F., México.
- Moya, C. R. 1991.** Estadística Descriptiva Ed. San Marcos. Perú.
- NOVOZYMES, A.S. 2002.** Alimentos/2002-21757-01. pdf. Ficha de aplicación. Hidrólisis Enzimática de Proteínas Utilizando Proteasas de Novozymes.
- NTP ITINTEC 209.004:1968.** Aceites y grasas

comestibles. Método de determinación del contenido de humedad y materias volátiles. Lima, Perú.

NTP ITINTEC 209.057:1980. Aceite y grasas comestibles. Método de determinación de la materia insaponificable. Lima, Perú.

NTP ITINTEC. 209.217:1983. Aceite y grasas comestibles. Valor de anisidina. Lima, Perú.

NTP ITINTEC 312.010: 1985. Aceite y grasas comestibles. Acidez libre. Lima, Perú.

Park, J. W. (Ed.). 2000. Surimi and surimi seafood. Boca Raton, Fl., USA.

Ramírez, A. 2006. Valorización de subproductos de la salmonicultura mediante biotecnología enzimática. Informe final. Fundación Chile. Santiago, Chile.

Salas, A. ; Ayala, M. E. y Albrecht, M. 2003. Cuantificación de ácidos grasos omega 3 en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante los años 1996 al 2000. *Boletín de Investigación del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú* (5),1-11. Lima, Perú.

Unión Europea. 2008. Reglamento (CE) N° 1022/2008 de la Comisión, de 17 de octubre de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2074/2005 en lo que respecta a los valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT). *Diario Oficial, 18 de octubre de 2008.*

Wiseman, A. 1991. Manual de biotecnología de las enzimas. 2a. ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España.