

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas
del proceso de hidrólisis de proteínas de Anchoqueta Peruana
(*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales”.**

**Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en
Biotecnología**

Autores:

**Bach. Jiménez Revilla, Romina Lucerito
Bach. Sanchez Moncada, Benji Jhonatán**

Asesor:

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

**Nuvo Chimbote - Perú
2022**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas del proceso de hidrólisis de proteína de Anchoqueta Peruana (*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales”.

Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en Biotecnología

Revisado y aprobado por el Asesor:

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto
DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:

Dr. Willian Robert Capa Robles
PRESIDENTE

DNI: 32969285
ID ORCID: 0000-0003-3402-613X

M. Sc. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta
INTEGRANTE

DNI: 42636735
ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

M. Sc. Eterio Amaranto Alva Muñoz
INTEGRANTE

DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el aula de la Escuela de Posgrado, siendo las 17:05 horas del día 13 de enero del 2023, dando cumplimiento a la Resolución N° 357-2022-UNS-CFC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Willian Robert Capa Robles, teniendo como miembros a Ms.C. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta (secretario) y Ms.C. Eterio Amaranto Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licencia en Biotecnología, realizado por los tesisistas **Br. Benji Jhonatán Sanchez Moncada** y **Br. Romina Lucerito Jiménez Revilla**, quienes sustentaron la tesis intitulada:

“Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en el proceso de hidrólisis de proteína de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales”

Terminada la sustentación, los tesisistas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **APROBADO** asignándole un calificativo de **18 puntos**, según el artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS).

Siendo las 18:13 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



.....
Nombre: Dr. Willian R. Capa Robles
Presidente



.....
Nombre: Ms.C. Víctor E. Lecca Zavaleta
Secretario



.....
Nombre: Ms.C. Eterio A. Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas (02) y archivo FC (02).



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Romina Lucerito Jiménez Revilla estudiante / docente de la

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado	Maestría	<input type="checkbox"/>	Doctorado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas del proceso de hidrólisis de proteína de Anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales

presentado en 95 folios, para la obtención del Grado académico: ()

Título profesional: (X) Investigación anual: ()

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, 02 de Febrero de 2023

Firma:

Nombres y Apellidos: Romina Lucerito Jiménez Revilla

DNI: 71047587

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesis e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Benji Jhonatán Sanchez Moncada estudiante / docente de la

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado	Maestría		<input type="checkbox"/>	Doctorado		<input type="checkbox"/>

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas del proceso de hidrólisis de proteína de Anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales

presentado en 95 folios, para la obtención del Grado académico: ()

Título profesional: (X) Investigación anual: ()

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, 02 de Febrero de 2023

Firma:

Nombres y Apellidos: Benji Jhonatán Sanchez Moncada

DNI: 48149303

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesistas e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.

DEDICATORIA

A mis padres, Ruth y Miguel, que admirablemente continúan luchando día a día a través de los años.

A mi abuela Fredesvinda, cuya nobleza me forjó, ahora está en el cielo que siempre se ha merecido.

A mi familia; mi hermano Gino y mis queridas primas y tía, Ale, Piera y Welka.

A las personas que aún creen y me ayudan a creer en mí.

Benji S. Moncada

A mis padres, Mary y Mitchel, que son mi mayor ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Bryan y Willian, que me motivan a seguir creciendo.

A mis amigos, especialmente a Kelvin, por su cariño y apoyo incondicional.

Romina Jiménez Revilla

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Escuela Profesional de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa por darnos la oportunidad de desarrollarnos en este fascinante campo de la ciencia y la biotecnología, especialmente a aquellos docentes que demostraron una gran virtud para enseñar.

A los compañeros y profesionales del Laboratorio de Calidad e Investigación de COPEINCA-Chancay, quienes nos dieron su apoyo, especialmente Normita y Eder por darnos un espacio para desarrollar esta investigación y Oriana quien nos apoyó en cada experimento.

A mis padres Ruth y Miguel por su apoyo desde el inicio de mi carrera universitaria, siempre conté con su aceptación y soporte en todas mis decisiones, fueran buenas o no tanto.

A mi abuelita que siempre estará conmigo.

A los amigos, compañeros y colegas que tuvieron algo bueno que decir. Especialmente Renzo, quien me apoyó para lograr entrar a esta carrera profesional.

Benji S. Moncada

A mis padres, Mary y Mitchel, que son mi ejemplo a seguir, gracias a su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Romina Jiménez Revilla

ÍNDICE

Conformidad del Asesor	i
Conformidad del Jurado Evaluador	ii
Acta de Calificación de la Sustentación de Tesis	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Índice	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xiii
Resumen	xiv
ABSTRACT	xv
CAPITULO I:.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2. Formulación de la hipótesis	3
1.3. Justificación e importancia	4
1.4. Antecedentes.....	5
1.5. Marco conceptual.....	8
1.5.1. Anchoveta peruana	8
1.5.1.1. Descripción taxonómica	8
1.5.1.2. Características de la especie	8
1.5.1.3. Composición química y nutricional	9
1.5.2. Pesca de anchoveta en el Perú	11
1.5.2.1. Harina de pescado	11
1.5.2.2. Aceite de pescado.....	13
1.5.3. Hidrólisis de proteínas	14
1.5.3.1. Definición	14

1.5.3.2.	Tipos de hidrolisis.....	14
1.5.3.2.1.	Hidrolisis química	14
1.5.3.2.2.	Hidrólisis enzimática.....	14
1.5.3.3.	Grado de hidrólisis	15
1.5.3.4.	Recuperación de proteínas	16
1.5.4.	Proteasas	16
1.5.4.1.	Definición.....	16
1.5.4.2.	Clasificación.....	16
1.5.4.3.	Proteasas comerciales.....	17
1.5.5.	Hidrólisis enzimática de proteínas.....	19
1.5.5.1.	Mecanismo de hidrólisis enzimática de proteínas.....	19
1.5.5.2.	Propiedades de hidrolizados de proteína.....	21
1.5.5.2.1.	Actividad funcional	21
1.5.5.2.2.	Actividad bioactiva	21
1.5.6.	Hidrolizado de proteína de pescado.....	21
1.5.7.	Optimización del proceso de hidrólisis	22
1.5.7.1.	Metodología de superficie de respuesta (MSR)	23
1.5.7.2.	Aplicación de la MSR	24
CAPITULO II.....		28
II. MATERIALES Y MÉTODOS		28
2.1.	Diseño experimental	28
2.2.	Material biológico.....	32
2.2.1.	Materia prima	32
2.2.2.	Enzimas comerciales	32
2.2.3.	Proceso de hidrólisis enzimática.....	34
2.3.	Métodos analíticos	35
2.3.1.	Caracterización de materia prima y productos	35
2.3.2.	Cuantificación de actividad enzimática.....	35
2.3.3.	Determinación del Grado de Hidrólisis (%GH)	36
2.3.4.	Determinación de la Recuperación de Proteína soluble (%RPS).....	36
2.4.	Análisis estadístico	36

CAPITULO III:	37
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Caracterización fisicoquímica de la materia prima.....	37
3.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	38
3.3. Hidrólisis enzimática de Anchoveta	41
3.3.1. Efectos sobre la Recuperación de Proteína Soluble (%RPS)	46
3.3.2. Efectos sobre el Grado de Hidrólisis (%GH)	52
3.4. Optimización de la hidrólisis enzimática de anchoveta.....	58
3.4.1. Perfil de deseabilidad y condiciones óptimas.....	58
3.4.2. Validación de condiciones óptimas	60
CAPITULO IV:	66
IV. CONCLUSIONES.....	66
CAPITULO V:	67
V. RECOMENDACIONES.....	67
CAPITULO VI:	68
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CAPITULO VII.....	82
VII. ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química promedio de la Anchoveta peruana	9
Tabla 2. Composición mineral promedio de la anchoveta peruana.....	9
Tabla 3. Composición promedio de ácidos grasos presentes en la Anchoveta peruana.....	10
Tabla 4. Composición química promedio de la harina de anchoveta.....	12
Tabla 5. Composición química proximal del aceite de anchoveta peruana.....	13
Tabla 6. Características de algunas proteasas comerciales.....	18
Tabla 7. Características de las moléculas producidas en la hidrólisis de proteínas.....	19
Tabla 8. Niveles de estudio para los experimentos de Hidrólisis Enzimática de Anchoveta peruana con las enzimas Corolase 7089 y Corolase 8000.....	29
Tabla 9. Diseño experimental factorial Modelo de Box-Behnken para los ensayos experimentales de Hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana con enzimas comerciales.	30
Tabla 10. Datos de fichas técnicas de proteasas comerciales.....	33
Tabla 11. Composición química proximal de la Anchoveta peruana (<i>Engraulis ringens</i>) utilizada en los experimentos de hidrólisis enzimática.....	37
Tabla 12. Actividad enzimática (U*/ml) de las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 a pH=6.1 y distintas temperaturas de incubación (50, 60 y 70°C).....	38
Tabla 13. Resultados experimentales del modelo factorial Box-Benhken para la hidrólisis enzimática de Anchoveta.....	42
Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables respuesta Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH) con el modelo no ajustado.....	45
Tabla 15. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS).....	47

Tabla 16. Efectos estimados, significancia y coeficientes del modelo ajustado para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS).....	48
Tabla 17. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH).....	53
Tabla 18. Efectos estimados, significancia y coeficientes del modelo ajustado para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH).	54
Tabla 19. Valores óptimos experimentales y respuestas pronosticadas de las variables Recuperación Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH).	58
Tabla 20. Condiciones óptimas de hidrólisis enzimática de Anchoqueta entera para la validación experimental.....	60
Tabla 21. Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la hidrólisis de Anchoqueta entera con Corolase 8000 y Corolase 7089.....	61
Tabla 22. Composición fisicoquímica del Hidrolizado líquido de Anchoqueta entera elaborado en condiciones óptimas de hidrólisis.	65
Tabla 23. Procedimiento del ensayo de cuantificación de actividad enzimática proteasa. ..	85
Tabla 24. Preparación de la curva de calibración de tirosina.	86
Tabla 25. Cálculo de actividad enzimática de Corolase 8000 a 60°C.....	88
Tabla 26. Cálculo de Grado de Hidrólisis de hidrolizados de anchoqueta por método OPA.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de proteasas. Fuente: Theron y Divol (2014).....	17
Figura 2. Mecanismo de acción de la hidrólisis de proteína.	20
Figura 3. Representación de Superficie de respuesta de un modelo de primer orden. Fuente: Adaptado de Gutiérrez y Vara (2008).	25
Figura 4. Representación de Superficie de respuesta de un modelo de segundo orden. Adaptado de Gutiérrez y Vara (2008)	26
Figura 5. Representación de diseño de Box-Behnken para tres factores.....	27
Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la presente investigación.	31
Figura 7. Actividad Enzimática Proteasa (AEP) de Corolase 8000 y Corolase 7089 sobre el sustrato caseína en el rango de temperaturas de 50 °C - 70 °C a pH 6.1 durante 10 minutos de incubación.....	40
Figura 8. Carta de Pareto para las variables respuesta en la Hidrólisis de Anchoqueta. a) Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y b) Grado de Hidrólisis (%GH).	44
Figura 9. Gráficos de Superficie de Respuesta y Contorno para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS). a) Interacción Enzima 1 vs Enzima 2 (Temperatura nivel central: 60°C). b) Interacción Enzima 1 vs Temperatura (Enzima 2 nivel central: 0.5%). c) Interacción Enzima 2 vs Temperatura (Enzima 1 nivel central: 1.5%).....	51
Figura 10. Gráficos de Superficie de Respuesta y Contorno para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH). a) Interacción Enzima 1 vs Enzima 2 (Temperatura nivel central: 60°C). b) Interacción Enzima 1 vs Temperatura (Enzima 2 nivel central: 0.5%). c) Interacción Enzima 2 vs Temperatura (Enzima 1 nivel central: 1.5%).....	57
Figura 11. Perfiles de predicción y deseabilidad para las variables respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH).	59

Figura 12. Cinética de la hidrólisis enzimática de Anchoveta en condiciones estándar (P.C.) y optimizadas (OPT). a) Comparación de la variable Grado de Hidrólisis (%GH). b) Comparación de la variable Recuperación Proteína Soluble (%RPS).	63
Figura 13. Ficha técnica de enzima Corolase 7089. Fuente: ABEnzyme, 2017.	82
Figura 14. Ficha técnica de enzima Corolase 8000. Fuente: ABEnzymes, 2017.....	83
Figura 15. Curva de calibración de Tirosina. Fuente: elaboración propia.	87
Figura 16. Preparación de la curva de calibración. Tubos de ensayo con diferentes concentraciones de tirosina muestran una escala de intensidad de la coloración al reaccionar con el reactivo Folin & Ciocaltea's	87
Figura 17. Determinación de grado de hidrólisis por el método OPA. Preparación de las muestras y Lectura de absorbancia en espectrofotómetro para el análisis de los hidrolizados enzimáticos de anchoveta.	90
Figura 18. Anchoveta peruana (<i>Engraulis ringens</i>) utilizada en este estudio. Ejemplares adultos (longitud mayor de 12 cm).....	92
Figura 19. Bioreactor (Marca Applikon, modelo Ez2-control) empleado en los experimentos de hidrólisis enzimática. Vaso del bioreactor conteniendo el hidrolizado líquido de anchoveta.	93
Figura 20. Hidrolizado líquido de anchoveta. Separación de fases mediante centrifugación: se muestra la fase oleosa (superior), soluble (centro) e insoluble (inferior). A) Estado inicial (antes de iniciar la hidrólisis); se observa un 30% de fase insoluble y una fase soluble poco clarificada. B) Estado final (120 minutos de hidrólisis): se observa un elevado porcentaje de solubilización, reduciéndose la fase insoluble a un 10% de la capacidad del tubo, con una fase soluble más oscura y fase oleosa casi nula.....	94

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Fichas Técnicas de proteasas comerciales Corolase 7089 y Corolase 8000	82
ANEXO 2. Cuantificación de Actividad enzimática usando caseína como sustrato (Cupp-Enyard, 2008).	84
ANEXO 3. Método ortoftaldehído (OPA) para determinación del Grado de Hidrólisis (Nielsen <i>et al.</i> , 2001; Guo <i>et al.</i> , 2019).	89
ANEXO 4. Hidrólisis enzimática de anchoveta peruana (imágenes).....	92

RESUMEN

La anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) es un importante recurso hidrobiológico en la pesquería peruana dadas sus destacables propiedades nutricionales y su elevada disponibilidad, siendo un sustrato idóneo para la elaboración de productos con mayor valor agregado como los hidrolizados de proteína de pescado (HPP). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue realizar la hidrólisis enzimática de proteína de Anchoveta peruana entera con las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 (AB Enzymes) y optimizar las condiciones de hidrólisis para mejorar los rendimientos del proceso. En una primera etapa se determinó la composición fisicoquímica proximal de la anchoveta y luego se evaluó la actividad de las enzimas comerciales sobre el sustrato caseína en el rango de incubación de 50-70°C. Posteriormente, se empleó un modelo experimental factorial de diseño Box-Benhken para evaluar las variables: concentración de Enzima 1 (Corolase 8000) (0 - 3% p/p), concentración de Enzima 2 (Corolase 7089) (0 – 1.2% p/p) y Temperatura de hidrólisis (50 - 70°C) con la finalidad de evaluar sus efectos sobre el Grado de Hidrólisis (%GH) y la Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y, finalmente, maximizar estas variables mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Los resultados indicaron que la Anchoveta peruana entera utilizada en este estudio estuvo compuesta por $17.46 \pm 0.31\%$ de proteína cruda, $75.82 \pm 0.23\%$ de humedad, $3.35 \pm 0.02\%$ de ceniza y 4.61 ± 0.25 de grasa. Las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 mostraron una actividad de 827.5 ± 3.5 U/ml y 1049.6 ± 138.1 , respectivamente, a 60°C y pH 6.1; y Corolase 8000 fue más termotolerante (70°C) en comparación con Corolase 7089. Por último, mediante la MSR, se determinó que las condiciones óptimas para la hidrólisis de Anchoveta peruana entera con Corolase 8000 fueron un 3.0% p/p de enzima y 50°C de temperatura durante 120 minutos de hidrólisis, sin necesidad de utilizar Corolase 7089, y se alcanzó un %GH máximo de 30.9 ± 3.6 % y un %RPS de 84.3 ± 0.8 %.

Palabras claves: Anchoveta, hidrólisis de proteínas, proteasas, Corolase 8000, Corolase 7089, metodología de superficie de respuesta (MSR).

ABSTRACT

The Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) is an important hydrobiological resource in the Peruvian fishery given its remarkable nutritional properties and its high availability, being an ideal substrate for the production of products with higher added value such as fish protein hydrolysates (FPH). In this sense, the objective of the present work was to carry out the enzymatic hydrolysis of whole Peruvian Anchoveta protein with the commercial proteases Corolase 8000 and Corolase 7089 (AB Enzymes) and optimize the hydrolysis conditions to improve the yields of the process. In a first stage, the proximal physicochemical composition of the anchovy was determined and subsequently the activity of commercial enzymes on the casein substrate was evaluated in the incubation temperature range of 50-70°C. Subsequently, a factorial experimental model (Box-Benhken design) was used to evaluate the factors: concentration of Enzyme 1 (Corolase 8000) (0 - 3% w/w), concentration of Enzyme 2 (Corolase 7089) (0 - 1.2% w/w) and hydrolysis temperature (50 - 70°C) in order to evaluate their effects on the Degree of Hydrolysis (DH) and Soluble Protein Recovery (SPR) and, finally, maximize these variables through the Response Surface Methodology (RSM). The results indicated that the whole Peruvian Anchovy used in this study was composed of $17.5 \pm 0.3\%$ crude protein, $75.8 \pm 0.2\%$ moisture, $3.4 \pm 0.02\%$ ash and 4.6 ± 0.3 crude fat. The commercial proteases Corolase 8000 and Corolase 7089 showed an activity of 827.5 ± 3.5 U/ml and 1049.6 ± 138.1 , respectively, at 60°C and pH 6.1; and Corolase 8000 was more thermotolerant (70°C) compared to Corolase 7089. Finally, it was determined by RSM that the optimal conditions for the hydrolysis of whole peruvian anchovy with Corolase 8000 were 3.0% w/w of enzyme and 50°C for 120 minutes of hydrolysis, no need to use Corolase 7089, and a maximum %DH of $30.9 \pm 3.6\%$ and a %SPR of $84.3 \pm 0.8\%$ were reached.

Keywords: Anchovy, protein hydrolysis, proteases, Corolase 8000, Corolase 7089, Response Surface Methodology (RSM).

CAPITULO I:

I. INTRODUCCIÓN

La anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) es un recurso hidrobiológico de gran importancia en la economía del Perú, dado a que su extracción y procesamiento representan una parte importante de la actividad pesquera nacional (Bouchon, 2018). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO] (2020), la pesca de anchoveta peruana representó el 7.3% de la producción pesquera mundial en el 2018; siendo la industria de harina y aceite de pescado el principal destino de este recurso pesquero, los cuales correspondieron al 86% y 14% del total del volumen procesado como producto terminado, respectivamente, para ese año (Ministerio de Producción [PRODUCE], 2021).

La elevada disponibilidad de este recurso y sus características nutricionales representan un buen incentivo para el crecimiento del sector pesquero del país mediante la diversificación de su procesamiento, contando con un gran potencial para la elaboración de hidrolizados de proteínas de pescado (HPP). Estos productos hidrolizados tienen una gran importancia dadas sus propiedades nutricionales, su valor proteico y sus propiedades funcionales y bioactivas, las cuales derivan de los péptidos de bajo peso molecular formados durante la hidrólisis; tales como la actividad antihipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, neuroprotectora, entre otras (Abuine *et al.*, 2019).

El método enzimático ha demostrado ser la vía más óptima para la elaboración de los hidrolizados de proteína pescado (HPP), ya que, a diferencia del método químico, este se lleva a cabo en condiciones menos agresivas y no altera los productos resultantes de la reacción (Yin *et al.*, 2012; Zamora-Sillero *et al.*, 2018). Sin embargo, la hidrólisis enzimática presenta ciertas limitaciones en su aplicación, entre ellas los bajos rendimientos, la necesidad de un tratamiento de inactivación enzimática, la dificultad para estandarizar un producto con determinadas características bioactivas y organolépticas, y, sobre todo, el costo de las enzimas industriales (Li-Chan, 2015; Petrova *et al.*, 2018); lo cual dificulta que la elaboración de los HPP sea

económicamente viable para la industria. No obstante, un mecanismo para suplir estas limitaciones es identificar las proteasas idóneas y sus condiciones óptimas de reacción para el proceso de hidrólisis.

En base a lo anterior mencionado, esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y concentración de enzimas del proceso de hidrólisis enzimática de proteína de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) con las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089, como un método para mejorar el rendimiento de la hidrólisis mediante la obtención de hidrolizados con elevado porcentaje de recuperación de proteína soluble y grado de hidrólisis.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en el proceso de hidrólisis de proteína de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) con las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 (AB Enzymes).

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química de la materia prima Anchoveta peruana.
- Determinar la actividad de las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 sobre el sustrato caseína en el rango de temperatura de 50-70°C.
- Determinar los parámetros óptimos de temperatura y concentración de enzimas del proceso de hidrólisis de Anchoveta peruana.
- Validar los valores de temperatura y concentración de enzimas óptimas de hidrólisis de Anchoveta peruana.

1.2. Formulación de la hipótesis

La temperatura y la concentración de enzimas tienen un efecto positivo sobre la hidrólisis de la anchoveta a unas condiciones óptimas de 70°C, 3% p/p de Corolase 8000 y 2% p/p de Corolase 7089, alcanzando una recuperación de proteína soluble del 85% y un grado de hidrólisis del 30%.

1.3. Justificación e importancia

Los procesos enzimáticos tienen un elevado potencial en los sectores productivos en nuestro país y la tecnología enzimática ha demostrado ser una herramienta eficiente para la elaboración de hidrolizados de proteínas de pescado, por lo que es necesario realizar estudios a fin de optimizar estas aplicaciones.

Actualmente, son escasos los estudios de la hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana encontrados en la literatura; siendo las condiciones óptimas reportadas diferentes y específicas para la enzima aplicada en cada investigación. Las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 (AB Enzymes), que presentan termoestabilidad y capacidad de actuar bajo condiciones de pH neutro, son aptas para su aplicación en la hidrólisis de la anchoveta peruana. Por ello, esta investigación busca evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la hidrólisis, y determinar sus niveles óptimos, a fin de mejorar la estabilidad de las proteasas y del sustrato para obtener valores elevados de Recuperación de Proteína Soluble y Grado de Hidrólisis, lo que conlleva a la mejora de los rendimientos del proceso y del uso de estas enzimas comerciales.

Esta investigación contribuye en diversificar el uso del recurso anchoveta, al desarrollar un proceso de hidrólisis con un alto rendimiento; de esta forma se otorga información que puede aplicada a mayor escala. Así también, se promueve la biotecnología en la industria pesquera, mediante la aplicación de procesos enzimáticos que mejoran los rendimientos y disminuyen los costos de los procesos productivos tradicionales, y también la proyección a la elaboración de hidrolizados de proteínas a partir de otras fuentes hidrobiológicas.

1.4. Antecedentes

La producción pesquera peruana es una de la más importante en el mundo, ya que el Perú es considerado el tercer país con más actividad pesquera después de China e Indonesia; en 2018, la producción pesquera alcanzó 96,4 millones de toneladas a nivel mundial, siendo la anchoveta peruana una importante especie de captura, con más de 7 millones de toneladas (FAO, 2020). Según el Ministerio de Producción (PRODUCE, 2021), entre enero y mayo de 2021, la pesquería de anchoveta en el Perú alcanzó un volumen de extracción de 2249.7 toneladas y un volumen de transformación de 627 toneladas brutas. Este procesamiento industrial fue muy productivo a nivel nacional, ya que durante el primer trimestre de 2021 alcanzó un valor de US\$ 1,137 millones, que representa el 10.2% de las exportaciones totales, de las cuales destacaron los productos tradicionales de harina y aceite de pescado, alcanzando US\$ 587 millones y US\$ 139 millones respectivamente; siendo los principales destinos China, Japón y Taiwán (Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI],2021).

Actualmente, la harina de pescado es empleada como ingrediente de alimentos balanceados para la acuicultura, avicultura, ganadería, entre otros; mientras que el aceite de pescado tiene aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y medicina (Banco Wiese Sudameris, 2002). Además, la anchoveta es utilizada por su alto valor nutricional en la industria de consumo humano directo (CHD), ya que otorga una fuente importante de proteínas de alta calidad, así como aminoácidos esenciales y vitaminas A y D; asimismo, presenta alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente omega-6 y omega-3 (EPA y DHA), cuyo consumo proporciona importantes beneficios nutricionales (International Fishmeal and Fish Oil Organization [IFFO], 2007).

En este sentido, la alta disponibilidad de este recurso pesquero y los elevados costos de la harina de pescado representan una oportunidad para diversificar sus usos como materia prima de alta calidad. Como alternativa, en el año 2010, el Ministerio de Producción incrementó el incentivo de la pesca de anchoveta peruana destinado al consumo humano directo mediante el D.S. 010-2010-PRODUCE; sin embargo, esta iniciativa presentó ciertos problemas dado que la producción de harina de pescado

produce mayores beneficios a nivel económico, siendo los productos para consumo humano más costosos debido a los insumos que se utilizan en su elaboración (Bouchon, 2018).

Los Hidrolizados de Proteína de Pescado (HPP) tienen características nutricionales importantes dado su elevado contenido proteico (normalmente superior al 75% de proteína en peso seco), propiedades funcionales como su capacidad espumante y emulsificadora, que son muy importantes para la industria alimentaria, y también por sus cualidades bioactivas que derivan de los péptidos de bajo peso molecular formados durante la hidrólisis de proteínas, entre estas se encuentra la actividad antihipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, neuroprotectora, entre otras (Abuine *et al.*, 2019; Li-Chan, 2015).

Diversos estudios sobre la hidrólisis enzimática de proteínas de pescado han sido realizados con distintas proteasas comerciales sobre diferentes sustratos provenientes de la industria pesquera y/o acuícola, tanto enteros como residuales. Entre estos se reportaron la hidrólisis realizada a partir de músculo de salmón (*Salmo salar*) con las enzimas comerciales Alcalase 2.4L, Flavourzyme 1000L, Corolase PN-L y Corolase 7089 (Kristinsson y Rasco, 2000) y con Alcalase 2.4L (See *et al.*, 2011); la hidrólisis de residuos de salmón con Protamex y bromelina/papaína (Opheim, 2015); y un estudio comparativo de hidrólisis con las proteasas Corolase 7089, Alcalase 2.4L, Promod 671L, Neutrased 0.8L y Protex 7L (Aspevik *et al.*, 2016). Así también, la hidrólisis de residuos de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) utilizando Alcalase 2.4L (Guerard y Dufosse, 2001) y la proteasa Protamex (Nguyen *et al.*, 2011). De la misma forma, se realizó la hidrólisis de vísceras de atún (*Euthynnus affinis*) con Alcalase 2.4L (Salwanee *et al.*, 2013), de la tilapia roja (*Oreochromis spp.*) con Alcalase 2.4L, Neutrased y Flavourzyme (Baez-Suarez *et al.*, 2016), de la caballa con Alcalase 2.4L (Ramakrishnan *et al.*, 2013); y la hidrólisis del esturión pérsico (*Acipenser persicus*) con Alcalase, Protamex, Neutrased, Flavourzyme y tripsina (Ovissipour *et al.*, 2012).

Respecto a la anchoveta peruana, en la literatura se han reportado investigaciones de la hidrólisis con la enzima Protamex y la optimización de los parámetros de dosis de enzimas, cantidad de sustrato y tiempo de hidrólisis (Sifuentes-Penagos *et al.*, 2018);

así también, la hidrólisis de la anchoveta peruana entera y sus residuos realizados a escala piloto (Pandía *et al.*, 2013), y de la anchoveta peruana entera y pota (*Dosidicus gigas*) con distintas combinaciones de proteasas, en el cual se comprobaron las propiedades bioactivas antibacterianas de estos hidrolizados en la alimentación de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Costa *et al.*, 2020).

Sin embargo, son escasos los estudios realizados con las proteasas Corolase 7089 y/o Corolase 8000 (AB Enzymes) sobre el sustrato anchoveta peruana. Roldán *et al.*, (2021) realizaron la hidrólisis con distintas enzimas comerciales incluyendo a Corolase 7089 sobre la anchoveta peruana con Protamex y Flavourzyme 1000L. Sin embargo, no se encontraron estudios de hidrólisis de anchoveta peruana realizados con Corolase 8000. Ambas proteasas comerciales son concentrados enzimáticos con alta estabilidad en su formulación, por lo que poseen características importantes para su aplicación y estudio en la hidrólisis de proteínas de anchoveta peruana, siendo potencialmente aplicables a los procesos de transformación pesquera.

1.5. Marco conceptual

1.5.1. Anchoveta peruana

1.5.1.1. Descripción taxonómica

La descripción taxonómica de la anchoveta peruana según Kleeberg y Nieto (2001); citado por Boré *et al.* (1989):

- **Reino:** Animal
- **Phylum:** Chordata
- **Sub-phylum:** Vertebrata
- **Superclase:** Pisces
- **Clase:** Osteichthyes
- **Familia:** Engraulidae
- **Género:** *Engraulis*
- **Especie:** *Engraulis ringens*

1.5.1.2. Características de la especie

La anchoveta peruana es un pez pelágico que tiene crecimiento rápido y tiempo de vida corto, posee un cuerpo largo y comprimido con una longitud promedio de 12-15cm, su coloración se presenta entre azul oscuro a verdoso en la parte posterior y color plateado en la parte inferior del vientre (Instituto del Mar del Perú [IMARPE], 2015)

Habita en zonas costeras moderadamente frías entre 14-23°C, distribuida en el litoral peruano y chileno desde la latitud 4° S hasta la latitud 42° 30' S, mediante tres subunidades poblacionales: Stock Norte (Centro del Perú), desde Paita (5°S) hasta San Juan de Marcona (15°S); Stock Sur (Sur del Perú - Norte de Chile), desde Chala (16°S) hasta Antofagasta (27°S); y el Stock Centro (Centro - Sur de Chile), desde San Antonio (34°S) hasta Valdivia (40°S); la importancia de los stocks disminuye de norte a sur, respectivamente, dependiendo de la productividad biológica (Bouchon *et al.* 2010; Cubillos *et al.* 2007).

Es una de las especies pelágicas de mayor importancia por su amplio volumen de captura anual, debido a su facultad de alcanzar la madurez sexual y desovar varias veces al año, principalmente en el periodo de julio – septiembre y febrero – marzo, donde alcanzan los niveles máximos de desove (Buitrón y Perea, 2000).

1.5.1.3. Composición química y nutricional

La anchoveta presenta la siguiente composición química, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. *Composición química promedio de la Anchoveta peruana*

COMPONENTE	PROMEDIO (%) EN BASE HÚMEDA (100 g)
Humedad	70.8
Grasa	8.2
Proteína	19.1
Sales minerales	1.2
Energía (Kcal/100g)	185

Fuente: Instituto del Mar Peruano (IMARPE) e Instituto Tecnológico del Perú (ITP), 1996.

Por otra parte, contiene componentes minerales, tal como sodio, potasio, calcio y magnesio (Tabla 2). Además, también es fuente de ácidos grasos (Tabla 3), siendo una de las especies con más alto contenido de ácidos grasos polinsaturados Omega 3, principalmente ácido docosahexaenoico (DHA) y Ácido eicosapentaenoico (EPA) (Mantilla, 2013).

Tabla 2. *Composición mineral promedio de la anchoveta peruana*

MINERAL	PROMEDIO (%) EN BASE HÚMEDA
Sodio (mg/100g)	78
Potasio (mg/100g)	241.4
Calcio (mg/100g)	77.1
Magnesio (mg/100g)	31.3

Fuente: IMARPE e ITP, 1996.

Tabla 3. Composición promedio de ácidos grasos presentes en la Anchoveta peruana.

ACIDO GRASO	NOMENCLATURA	PROMEDIO (%)
Mirístico	C14:0	10,1
Pentadecanoico	C15:0	0,4
Palmítico	C16:0	19,90
Palmitoeico	C16:1	10,5
Margárico	C17:0	1,3
Esteárico	C18:0	4,6
Oleico	C18:1	12,3
Linoléico	C18:2	1,8
Linolénico	C18:3	0,6
Aráquico	C20:0	3,7
Eicosaenoico	C20:1	traz.
Eicosatrienoico	C20:3	1,3
Araquidónico	C20:4	1,0
Eicosapentaenoico	C20:5	18,7
Docosatrienoico	C22:3	1,1
Docosatetraenoico	C22:4	1,2
Docosapentaenoico	C22:5	1,3
Docosaheptaenoico	C22:6	9,2

Fuente: Instituto del Mar Peruano (IMARPE), 1996.

1.5.2. Pesca de anchoveta en el Perú

La anchoveta peruana es el principal sustento de la industria pesquera peruana y es una de las más importantes a nivel mundial debido a sus amplios volúmenes de captura anual, además se caracteriza por su alta disponibilidad de captura, alta variabilidad de acuerdo a la disposición del alimento, así como su alto valor nutricional y su bajo costo (Mac Leod y Pezo, 2004; Bouchon, 2018).

No obstante, la anchoveta peruana no siempre ha sido abundante, ya que el sobredimensionamiento y la sobreexplotación de este recurso, así como los fenómenos de El Niño y La Niña generados por los cambios en los patrones del viento, han afectado su distribución, abundancia y condición física. A pesar de la variabilidad, la pesquería de anchoveta peruana presenta altos índices de desembarque pesquero industrial y es una de las actividades principales para la economía del Perú mediante la producción de harina y aceite de pescado (De La Puente *et al*, 2011).

En ese sentido, durante la primera temporada de pesca de anchoveta peruana en el año 2021 se generó US\$ 1065 millones en exportaciones de harina y aceite de pescado, con más de 60 mil puestos de trabajo, así como una recaudación fiscal de S/150.6 millones que contribuyen a la recuperación económica del país (PRODUCE, 2021).

1.5.2.1. Harina de pescado

La harina de pescado es un producto industrial, producido mediante la remoción del contenido de grasa y humedad del pescado entero, por acción térmica de secado a vapor y estabilizado por un antioxidante. En la industria de la harina de pescado existen dos tipos de productos, la harina estándar (FAQ), y la Harina Steam Dried; de las cuales la segunda es de mayor calidad y se caracteriza por utilizar materia prima fresca, secado a vapor a temperaturas menores a 95°C y tiempo mínimo de permanencia (Sánchez, 2019).

La harina de pescado presenta una de las fuentes más accesibles de proteínas de alta digestibilidad con un alto valor nutricional, por ello es empleada como

ingrediente de alimentos en la industria pecuaria, mejorando la fertilidad, el crecimiento y disminuyendo la incidencia de enfermedades (Civera *et al.*, 2019).

La composición química de la harina de anchoveta peruana es mostrada en la Tabla 4, donde resalta su alto contenido de proteínas y ácidos grasos, tal como omega 3, principalmente DHA y EPA; asimismo, contiene una amplia proporción de aminoácidos y minerales tales como sodio, cloro, manganeso, zinc, hierro, entre otros; y vitamina A, vitamina E, B12, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y colina (FAO, 1975).

Tabla 4. Composición química promedio de la harina de anchoveta.

COMPONENTE	CONTENIDO
Proteínas	64 - 68
Grasas	12% máximo
Humedad	6 – 10%
Cenizas	12 – 18%
Histamina	<500ppm<1000

Fuente: International Fishmeal and Fish Oil Organization (IFFO), 2007.

1.5.2.2. Aceite de pescado

El aceite de pescado se obtiene a partir de la elaboración de harina de pescado; y presenta un alto contenido de ácidos grasos de cadena larga omega-3; eicosapentaenoico (EPA, C20:5), docosapentaenoico (DPA, C22:5) y docosahexaenoico (DHA, C22:6) (Tabla 5), los cuales son muy valorados por sus atributos nutricionales y propiedades terapéuticas (Valenzuela, *et al.* 2012).

El aceite de pescado de anchoveta es ampliamente utilizado como suplemento alimenticio para la acuicultura, y es exportado principalmente a Noruega, Grecia, Italia y Turquía (FAO, 2021). Además, también tiene importancia nutracéutica y puede ser utilizado como suplemento para la salud humana; sin embargo, para que este producto sea destinado a consumo humano, es necesario realizar procesos adicionales de refinación y purificación (Valenzuela, *et al.* 2012).

Tabla 5. Composición química proximal del aceite de anchoveta peruana.

COMPONENTE	PROMEDIO
Ácidos grasos libres	<4%
Materia insaponificable	<2%
Humedad e Impurezas	<0.8%
Valor Yódico	160–180
Totox	20–35%
EPA omega-3	15–17%
DHA omega-3	7–9%

Fuente: IFFO, 2007.

1.5.3. Hidrólisis de proteínas

1.5.3.1. Definición

Según Kurniawan *et al.* (2012), la hidrólisis de proteínas es una degradación hidrolítica o simplificación molecular de enlaces proteicos complejos, mediante el uso de ácidos, bases o enzimas proteolíticas, con la finalidad de generar productos en forma de aminoácidos y péptidos.

Los hidrolizados de proteína poseen propiedades nutricionales y funcionales, como una baja viscosidad, alta capacidad de agitación, dispersión y solubilidad; por lo que son ampliamente utilizadas como suplemento de proteínas, sustitutos de leche y potenciadores de sabor en productos de confitería para la industria de alimentos (Kristinsson y Rasco, 2000; Yin *et al.*, 2008).

1.5.3.2. Tipos de hidrolisis

1.5.3.2.1. Hidrolisis química

Este método de hidrólisis es llevado a cabo por el uso de ácidos fuertes o álcalis con la finalidad de romper los enlaces peptídicos en condiciones de temperatura y presión alta. Este mecanismo es más rápido y menos costoso, sin embargo, suele afectar la calidad general del producto al generarse productos indeseados por la escisión de enlaces peptídicos inespecíficos durante la fuerte reacción química (Wisuthiphaet *et al.*, 2015).

Estos productos indeseados pueden estar caracterizados por la racemización de aminoácidos, es decir, la conversión de L-aminoácidos en D-aminoácidos, los cuales no pueden ser metabolizados por humanos ni animales; así también, por la disminución, ausencia o inhibición de ciertos aminoácidos esenciales tales como triptófano, metionina y cisteína (Hall y Ahmad, 1997; Wisuthiphaet *et al.*, 2015).

1.5.3.2.2. Hidrólisis enzimática

Este tipo de hidrólisis se caracteriza por la aplicación de enzimas endógenas o exógenas denominadas proteasas, que cumplen la función de escindir sobre enlaces peptídicos específicos, por lo que es considerado un método más eficaz

que el método químico, ya que no es probable que se alteren las formas químicas de los sustratos (Yin *et al.*, 2012; Zamora-Sillero *et al.*, 2018).

El perfil del producto final depende de factores como el pH (1.5 – 11), temperatura (35 – 60 °C), tipo de enzima, concentración de enzima, concentración de sustrato y tiempo de reacción, los cuales influyen sobre el comportamiento cinético de las proteasas (Siddik *et al.*, 2021). Debido a esto, existe una configuración óptima de estas condiciones en las que una enzima exhibe su mayor actividad, como también puede desnaturalizarse (Zamora-Sillero *et al.*, 2018).

1.5.3.3. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es un indicador directo de la progresión de la hidrólisis el cual representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces. Este valor está determinado por las condiciones de pH, temperatura, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato y tiempo de reacción (Benítez *et al.*, 2008). Además, es un parámetro importante para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas, y se determina mediante varios métodos, entre ellos el método de ortoftaldehído (OPA) demostrado en la Ecuación 1 (Guo *et al.*, 2019).

$$\%GH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad [1]$$

Donde,

%GH : Grado de hidrólisis en porcentaje

h (meqv g⁻¹) : Número de enlaces hidrolizados

h_{tot} : número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína; h_{tot} depende de la fuente de proteína, siendo para pescado h_{tot}=8,6 meqv g⁻¹.

Los hidrolizados producidos para la industria alimentaria pueden ser clasificados por su grado de hidrólisis; de bajo GH (1-10%) para la mejora de las propiedades funcionales, de GH variable para el uso como saborizante, y extensivos o de alto GH (superior al 10%) para alimentación especializada (Benítez *et al.*, 2008).

1.5.3.4. Recuperación de proteínas

La recuperación de proteína (RP) es un indicador del grado de solubilización que se alcanza durante la reacción hidrolítica de las proteínas. Se expresa como la relación porcentual de la proteína recuperada en la fase soluble del hidrolizado respecto al contenido de proteína total del producto.

Generalmente, en una hidrólisis proteolítica se espera obtener altos porcentajes de proteína soluble a partir de la proteína cruda del sustrato, lo que indica una alta recuperación de péptidos y aminoácidos en el producto final.

1.5.4. Proteasas

1.5.4.1. Definición

Las proteasas, peptidasas o proteolíticas son parte de un extenso grupo de enzimas que cumplen la función de romper los enlaces peptídicos de las proteínas de manera selectiva, generando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres; teniendo una alta especificidad por el sustrato (Sabotič y Kos, 2012).

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en distintos organismos tales como animales, plantas, bacterias y hongos y son importantes en diversos procesos fisiológicos y metabólicos. Asimismo, son de gran importancia en la industria alimentaria, medicina, farmacia, detergentes y cueros, entre otros (Theron y Divol, 2014).

1.5.4.2. Clasificación

Las enzimas proteasas se pueden clasificar según su sitio de acción, el pH de acción y la naturaleza química del sitio catalítico. Por su sitio de acción se dividen en exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.22-99) (Figura 1); estas primeras actúan sobre los extremos de la cadena polipeptídica, por el extremo amino (aminopeptidasas) o en el carboxilo (carboxipeptidasa); mientras que las endopeptidasas actúan en regiones internas de la cadena polipeptídica (Barrett, 1994). Las endopeptinasas son más importantes a nivel industrial y se clasifican según su mecanismo catalítico, especificidad, estructuras

tridimensionales y por los residuos de aminoácidos presentes en su sitio activo (Sumantha y Pandey, 2006).

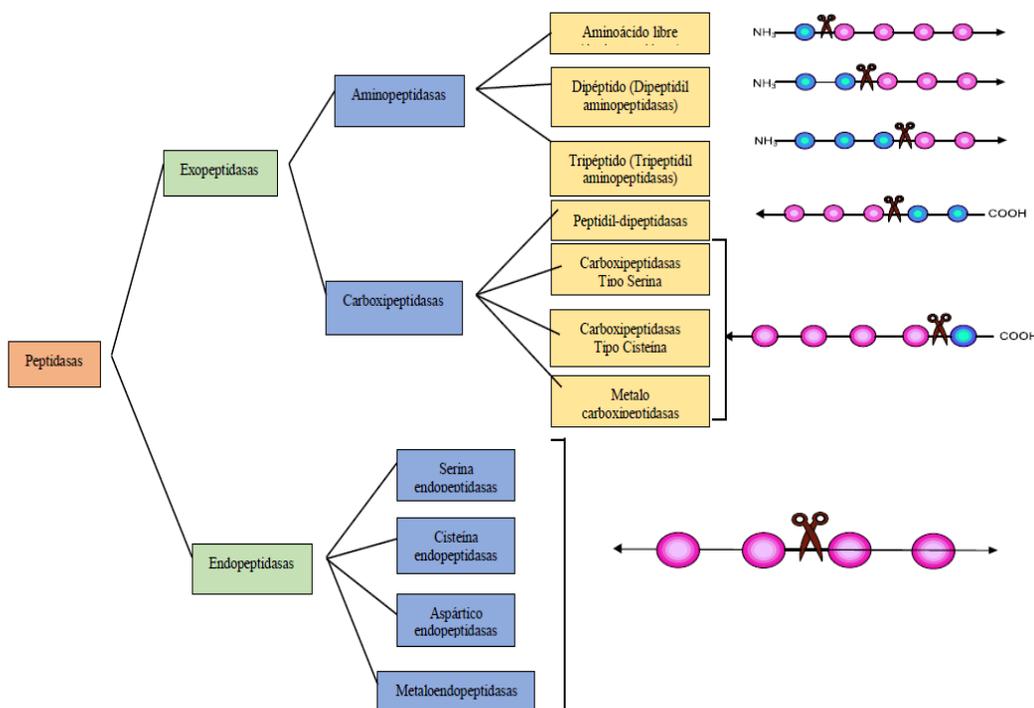


Figura 1. Clasificación de proteasas. Fuente: Theron y Divol (2014).

1.5.4.3. Proteasas comerciales

El uso de las enzimas proteolíticas en la industria alimentaria comenzó con las proteasas pancreáticas de animal; no obstante, las proteasas bacterianas y fúngicas han tomado relevancia a nivel industrial en el último tiempo. En la Tabla 6 se describen algunas proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado; estos preparados suelen ser mezclas concentradas y estabilizadas de enzimas y generalmente se presentan en estado líquido o en pellets secos.

Tabla 6. Características de algunas proteasas comerciales.

Enzima	Origen	Estabilidad	
		pH	T (°C)
Alcalase 0.6L	<i>B. licheniformis</i>	4 – 11.5	50 - 60
Neutrase	<i>B. subtilis</i>	6 – 8	45 - 55
Protease 660L	<i>B. subtilis</i>	7 – 10	50 - 70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6 – 9	45- 55
P.E.M. 2500 W	Tripsina porcina	6 – 10	30 – 60
	Tripsina bovina	6 – 10	25 – 45
	Quimiotrip. bovina		
Corolase PP	Tripsina	7 – 9	45 – 55
	Quimiotripsina		
Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5 – 7	50 – 60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6 – 8.5	55 – 60
Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6 – 9	35 – 45
Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7 – 9	40 – 50
Corolase 7107	<i>A. oryzae</i>	2 – 3	30 – 50
Bromelina	Vegetal (piña)	4 – 9	20 – 65
Takamina			
Papaína Takamina	Vegetal (papaya)	6 – 8	20 – 75

Fuente: Guadix *et al.*, 2000.

1.5.5. Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis de proteínas por el método enzimático es llevada a cabo mediante el control de temperatura, pH, agitación y tiempo de reacción en el proceso. Mientras transcurre la hidrólisis, la ruptura de los enlaces peptídicos causa la disminución del pH del medio; y una vez finalizada la reacción, la enzima se puede inactivar mediante la aplicación de altas temperaturas, la disminución del pH o se puede separar mediante filtración (Benítez *et al.*, 2008).

Los sustratos proteicos comúnmente empleados pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano. Entre los sustratos vegetales más utilizados se encuentran la proteína de soja, trigo y arroz; mientras que los sustratos de origen animal pueden ser el pescado, tanto entero como sus desechos, ya que presentan alto contenidos de proteína cruda (Dekkers *et al.*, 2011).

1.5.5.1. Mecanismo de hidrólisis enzimática de proteínas

Durante la hidrólisis de proteínas ocurre una serie de pasos de transformación o catálisis, donde las proteínas se convierten en proteosas, peptonas, péptidos y finalmente aminoácidos. Estas moléculas se diferencian entre sí por su grado de solubilidad, correspondiente al tamaño molecular (MW) y a la relación de amino/nitrógeno (AN/TN) (Guadix *et al.*, 2000), así como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de las moléculas producidas en la hidrólisis de proteínas.

Molécula	MW	AN/TN
Proteínas	> 20000	< 0.01
Proteosas	5000 - 10000	< 0.01
Peptonas	1000 – 6000	0.1 – 0.5
Péptidos	200 – 500	0.5 – 0.8
Aminoácidos	75 – 200	0.8 – 0.9

Fuente: Guadix *et al.*, 2000.

El proceso de hidrólisis está conformado por tres reacciones que ocurren de manera consecutiva: la formación de un complejo enzima-sustrato, la ruptura de enlace amídico que produce la liberación de un péptido; y finalmente, la separación del péptido restante y de la enzima después de un ataque nucleófilo de una molécula de agua. Este proceso se repite sobre los nuevos péptidos formados (Benítez *et al.*, 2008). Este mecanismo se representa en la Figura 2.

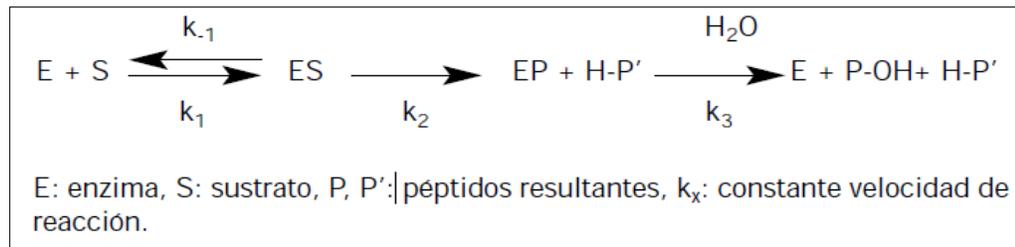
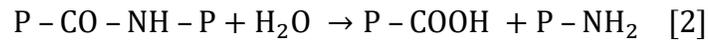
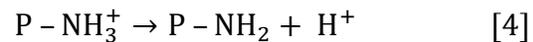


Figura 2. Mecanismo de acción de la hidrólisis de proteína.

La proteasa acciona sobre el enlace peptídico y libera el grupo amino y el grupo carboxilo según la ecuación 2:



Los grupos amino y carboxilo que se forman en la hidrólisis enzimática pueden estar parcialmente ionizados, según el pH del proceso (Guadix *et al.*, 2000), según los siguientes equilibrios mostrados en las siguientes ecuaciones 3 y 4.



1.5.5.2. Propiedades de hidrolizados de proteína

1.5.5.2.1. Actividad funcional

Son propiedades fisicoquímicas del alimento, que están relacionados con los péptidos y aminoácidos libres producidos por hidrólisis enzimática (Chalamaiah *et al.*, 2012). Los hidrolizados de proteína tienen una alta solubilidad en diversas concentraciones iónicas y niveles de pH, por lo general toleran altas temperaturas sin precipitarse. Además, contribuyen a las propiedades de retención de agua, textura, emulsificación y fijación de grasas cuando se agregan a los alimentos (Halim *et al.*, 2016).

1.5.5.2.2. Actividad bioactiva

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas específicas derivadas de fuentes vegetales o animales que poseen beneficios nutricionales e influyen positivamente en la salud (Hartmann y Meisel, 2007). Los hidrolizados de proteína son una fuente importante de péptidos bioactivos que tienen efectos antioxidantes, antihipertensivos, antimicrobianos, antiinflamatorios inmunomoduladores, antitrombóticos y anticancerígenos, los cuales dependen de la secuencia, composición y número de aminoácidos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015; Wang *et al.*, 2013).

La actividad antioxidante de las proteínas depende de la composición de aminoácidos; sin embargo, la estructura terciaria representa una de las mayores limitaciones debido a que algunos aminoácidos con potencial antioxidante quedan atrapados dentro del núcleo de la proteína donde son inaccesibles a los prooxidantes. Por lo tanto, la hidrólisis favorece el aumento de la actividad antioxidante de los péptidos (Elias *et al.*, 2008; Pazinatto *et al.*, 2013).

1.5.6. Hidrolizado de proteína de pescado

Los hidrolizados de proteína de pescado (HPP) son productos degradados de las proteínas de pescado que contienen aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, se obtienen mediante la hidrólisis química o enzimática de la materia

prima pescado; siendo el uso de enzimas el método más idóneo debido a que se obtiene productos de mayor calidad y funcionalidad (Venugopal, 2016).

Los HPP se caracterizan por presentar alto contenido de proteínas (81% – 93%), lípidos por debajo del 5%, de 3% – 8% de ceniza y de 1- 8% de humedad (Chalamaiah *et al.*, 2012). El elevado contenido de proteína se debe a la solubilización de las proteínas y la eliminación de compuestos insolubles, como lípidos y otros; lo cual le otorga estabilidad frente la oxidación de grasas y aumenta la vida útil del producto en condiciones de almacenamiento (Mamaugy y Ragaza, 2016).

La mayoría de los HPP tienen una presentación en polvo de color blanco cremoso, pero puede ser presentada en forma líquida, aunque es menos frecuente. Son ampliamente utilizados en la industria alimentaria por su alto contenido en aminoácidos esenciales, lo cual puede influir en sus características funcionales y bioactivas (Chalamaiah *et al.*, 2012).

1.5.7. Optimización del proceso de hidrólisis

La optimización estadística es el uso de métodos estadísticos con la finalidad de seleccionar las condiciones de operación más eficientes en un proceso de producción; esta técnica representa una importante herramienta cuantitativa en la toma de decisiones a nivel industrial, debido a que brinda una mejor comprensión del proceso (Brammah *et al.*, 2016).

Uno de los métodos más conocidos para la optimización de los procesos de hidrólisis es la metodología de superficie de respuesta (MSR), debido a que permite evaluar los efectos de múltiples factores y sus interacciones en una o más variables de respuesta (Auwal *et al.*, 2017; Silva, Eusébio y Cardoso, 2018).

1.5.7.1. Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La MSR fue desarrollada por Box y Wilson (1951) para optimizar los procesos de producción en la industria química; con el objetivo de lograr un alto rendimiento y pureza, que sea económicamente viable. Realizaron experimentos que involucraban factores como la temperatura, presión, tiempo de reacción y proporción de reactivos. Por lo tanto, este método se puede utilizar para optimizar cualquier respuesta que sea afectada por los niveles de uno o más factores cuantitativos (Nassiri, 2020).

La MSR es una estrategia experimental y de análisis que tiene como base estadística el modelo de regresión polinomial, permite modelar sistemas complejos, evaluar el efecto simultáneo de factores independientes, y así obtener las condiciones óptimas para las respuestas deseables de cada proceso (Tak et al., 2015; Braimah et al., 2016; Nassiri, 2020).

Además de analizar los efectos de las variables, el MSR genera un modelo matemático que permite predecir la respuesta de un sistema a cualquier condición nueva (Shankar et al. 2010). Por ello, es una herramienta importante para la investigación de procesos complejos y ha sido aplicado para optimizar las condiciones de hidrólisis de proteínas, donde principalmente se evalúan los factores de temperatura, pH, relación Enzima/Sustrato y tiempo de reacción (Majeed et al., 2016).

Es importante mencionar que, en estadística, el uso de sistemas computacionales especializados es fundamental en el diseño y optimización de estudios experimentales porque permite conocer el funcionamiento de un proceso y facilitar el análisis de datos en forma gráfica. Los programas más utilizados son STATISTICA, STATGRAPHICS, MINITAB, JMP-IN, MINITAB, UNSCRUMBLER, R- MATLAB, DESIGN-EXPERT (Gutiérrez y Vara, 2008; Hernández, 2007).

1.5.7.2. Aplicación de la MSR

La MSR permite determinar un punto óptimo del proceso mediante tres etapas, lo cuales son: cribado, búsqueda I (diseño de primer orden) y búsqueda II (diseño segundo orden).

1.5.7.2.1. Cribado:

Es la etapa inicial de la optimización de un proceso, el cual consiste en seleccionar los factores que más influyen en la variable de interés, que puede obtenerse de fuente teórica o experimental hasta seleccionar en lo posible de 2 a 4 factores (Gutiérrez y Vara, 2008).

1.5.7.2.2. Búsqueda I (Diseño de primer orden):

Esta etapa se aplica cuando en el proceso hay hasta 5 factores ($k \leq 5$), que influyen en la variable de respuesta (Gutiérrez y Vara, 2008). Los diseños más utilizados en esta etapa son los Diseños factoriales 2^k , Diseños factoriales fraccionados 2^{k-p} , Diseño de Plackett-Burman y Diseño simplex.

Si se tiene un factor $k=X_i$, el modelo de primer orden está representado por la ecuación 5:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad [5]$$

Donde, i representa el número de experimentos realizados ($i=1, 2, 3, \dots, n$), X_i es una variable independiente, e Y es una variable dependiente o de respuesta, β_0 y β_i son parámetros del modelo que se obtienen realizando la ecuación de la recta, ε es un error aleatorio con media cero (Gutiérrez y Vara, 2008).

La figura 3 representa un modelo de primer orden y se obtiene que su superficie es un plano.

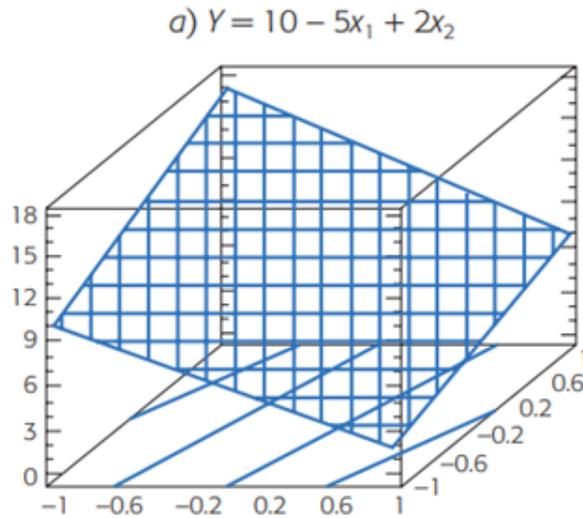


Figura 3. Representación de Superficie de respuesta de un modelo de primer orden. Fuente: Adaptado de Gutiérrez y Vara (2008).

1.5.7.2.3. Búsqueda II (Diseño de segundo orden):

Durante esta etapa se ajusta el modelo de segundo orden con el objetivo de determinar los efectos lineales, efectos de interacción y los efectos cuadráticos (curvatura) del modelo. Según Cornell (1990), si se tienen dos factores $k=X_i, X_j$, el modelo de segundo orden está representado por la ecuación 6:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad [6]$$

Donde, β_i representa el coeficiente de regresión para los términos de primer orden, β_{ii} es el coeficiente de los términos cuadráticos, β_{ij} es el coeficiente para los términos de producto cruz y ε es un error aleatorio con media cero (Gutiérrez y Vara, 2008). La figura 4 representa un modelo de segundo orden y se obtiene una superficie de máximo (montaña). Los diseños más utilizados en esta etapa son el Diseño de Box-Behnken, Diseño central compuesto y Diseño equirradial.

$$b) Y = 30 + 2x_1 + x_2 + x_1x_2 - 8x_1^2 - 10x_2^2$$

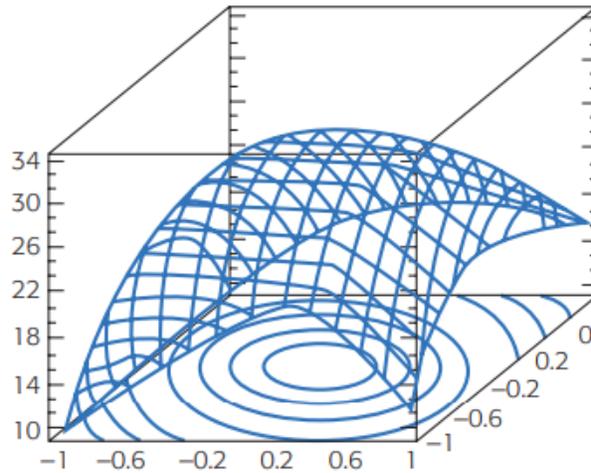


Figura 4. Representación de Superficie de respuesta de un modelo de segundo orden. Adaptado de Gutiérrez y Vara (2008)

Diseño de Box-Behnken

Este diseño de segundo orden se aplica cuando se trabajan con tres o más factores independientes, se distingue porque no incluye como tratamientos a los extremos de la región experimental, a diferencia de un diseño compuesto; Por ende, este diseño demuestra efectividad con respecto al número de experimentos reducido (Box y Behnken, 1960), lo cual se traduce en un ahorro en tiempo y materiales durante la fase experimental. En la figura 5 se muestran los 15 tratamientos del diseño Box-Behnken para tres factores, y su representación geométrica.

a) Matriz de diseño Box-Behnken

Tratamiento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	0	-1	-1
6	0	1	-1
7	0	-1	1
8	0	1	1
9	-1	0	-1
10	1	0	-1
11	-1	0	1
12	1	0	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

b) Representación geométrica de diseño Box-Behnken

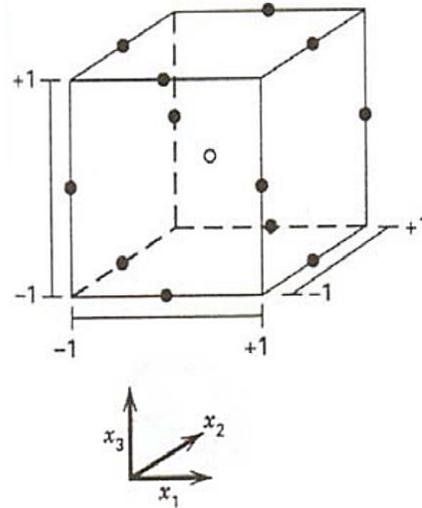


Figura 5. Representación de diseño de Box-Behnken para tres factores

1.5.7.2.4. Técnicas de optimización

Al ser seleccionado un modelo experimental validado, se analiza la superficie descrita por este para determinar la configuración de niveles que muestren un valor óptimo de la respuesta, ya sea la maximización o minimización de esta. De esta forma, se puede predecir la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro (Gutiérrez y Vara, 2008). La técnica de optimización a utilizar depende del tipo de modelo y existen tres métodos: Escalamiento ascendente (o descendente), Análisis canónico y Análisis de cordillera.

CAPITULO II:

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

En este trabajo se desarrolló la hidrólisis enzimática de anchoveta peruana entera (*Engraulis ringens*) con las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 para evaluar el efecto de las variables de temperatura y concentración enzimática, y determinar sus valores óptimos sobre las variables respuesta. El estudio se realizó con un diseño experimental factorial de Modelo Box-Benhken (de dimensión 2^3), para tres (03) variables y dos (02) respuestas, siendo las siguientes:

Variables independientes:

- **Enzima 1 (Corolase 8000)**; concentración expresada en porcentaje (% p/p) en base al contenido de proteína cruda en el sustrato anchoveta peruana, [gramo de enzima/gramo de proteína cruda * 100].
- **Enzima 2 (Corolase 7089)**; concentración expresada en porcentaje (% p/p) en base al contenido de proteína cruda en el sustrato anchoveta peruana, [gramo de enzima/gramo de proteína cruda *100].
- **Temperatura de hidrólisis**; expresado en grados Celsius (°C).

Variable dependiente (respuestas):

- **Recuperación de proteína soluble (%RPS)**; expresada como el porcentaje (%) de proteína soluble obtenida de la proteína cruda tras la hidrólisis enzimática.
- **Grado de Hidrólisis (%GH)**, expresado como el porcentaje (%) de escisión de los enlaces peptídicos, como indicador del progreso de la hidrólisis de las proteínas.

En la Tabla 8 se muestran los niveles de estudio donde se indican los rangos de concentración de enzimas y la temperatura de hidrólisis (°C) en los experimentos. Estos valores fueron establecidos en base a la información obtenida de las Fichas Técnicas

de las enzimas comerciales (ANEXO 1) y los datos preliminares otorgados por el Laboratorio de Calidad e Investigación de la empresa COPEINCA SAC – Sede Chancay.

Tabla 8. Niveles de estudio para los experimentos de Hidrólisis Enzimática de Anchoveta peruana con las enzimas Corolase 7089 y Corolase 8000.

Factor	Dimensión	Código	Niveles		
			Mínimo (-1)	Central (0)	Máximo (+1)
Enzima 1: Corolase 8000	% (g enzima/g proteína cruda)	X ₁	0.0	1.5	3.0
Enzima 2: Corolase 7089	% (g enzima/g proteína cruda)	X ₂	0.0	0.6	1.2
Temperatura	Celsius (°C)	X ₃	50	60	70

Los experimentos de hidrólisis fueron realizados según el plan experimental establecido en la Tabla 9, el cual se diseñó de acuerdo al modelo factorial de Box-Behnken en el software STATISTICA 10, obteniéndose un planeamiento factorial 2k que incluye doce (12) puntos factoriales y tres (03) puntos centrales con un total de 15 experimentos.

Posteriormente se aplicó el método de Superficie de Respuesta (MSR) para estudiar el efecto de las variables y determinar los valores óptimos que maximicen las respuestas: Porcentaje de Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y Porcentaje de Grado de Hidrólisis (%GH); según un perfil de deseabilidad compuesto.

Finalmente, los parámetros óptimos de Temperatura y Concentración de Enzimas determinados en la etapa anterior fueron validados mediante ensayos de Hidrólisis Enzimática de Anchoveta a condiciones óptimas y comparados con los valores respuesta de la predicción estadística del modelo matemático obtenido en el Software STATISTICA 10.

Tabla 9. Diseño experimental factorial Modelo de Box-Behnken para los ensayos experimentales de Hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana con enzimas comerciales.

Experi mento	Codificado			Reales		
	X ₁	X ₂	X ₃	Enzima 1 (%)	Enzima 2 (%)	Temperat ura (°C)
1	-1	-1	0	0.0	0.0	60
2	+1	-1	0	3.0	0.0	60
3	-1	+1	0	0.0	1.2	60
4	+1	+1	0	3.0	1.2	60
5	-1	0	-1	0.0	0.6	50
6	+1	0	-1	3.0	0.6	50
7	-1	0	+1	0.0	0.6	70
8	+1	0	+1	3.0	0.6	70
9	0	-1	-1	1.5	0.0	50
10	0	+1	-1	1.5	1.2	50
11	0	-1	+1	1.5	0.0	70
12	0	+1	+1	1.5	1.2	70
13	0	0	0	1.5	0.6	60
14	0	0	0	1.5	0.6	60
15	0	0	0	1.5	0.6	60

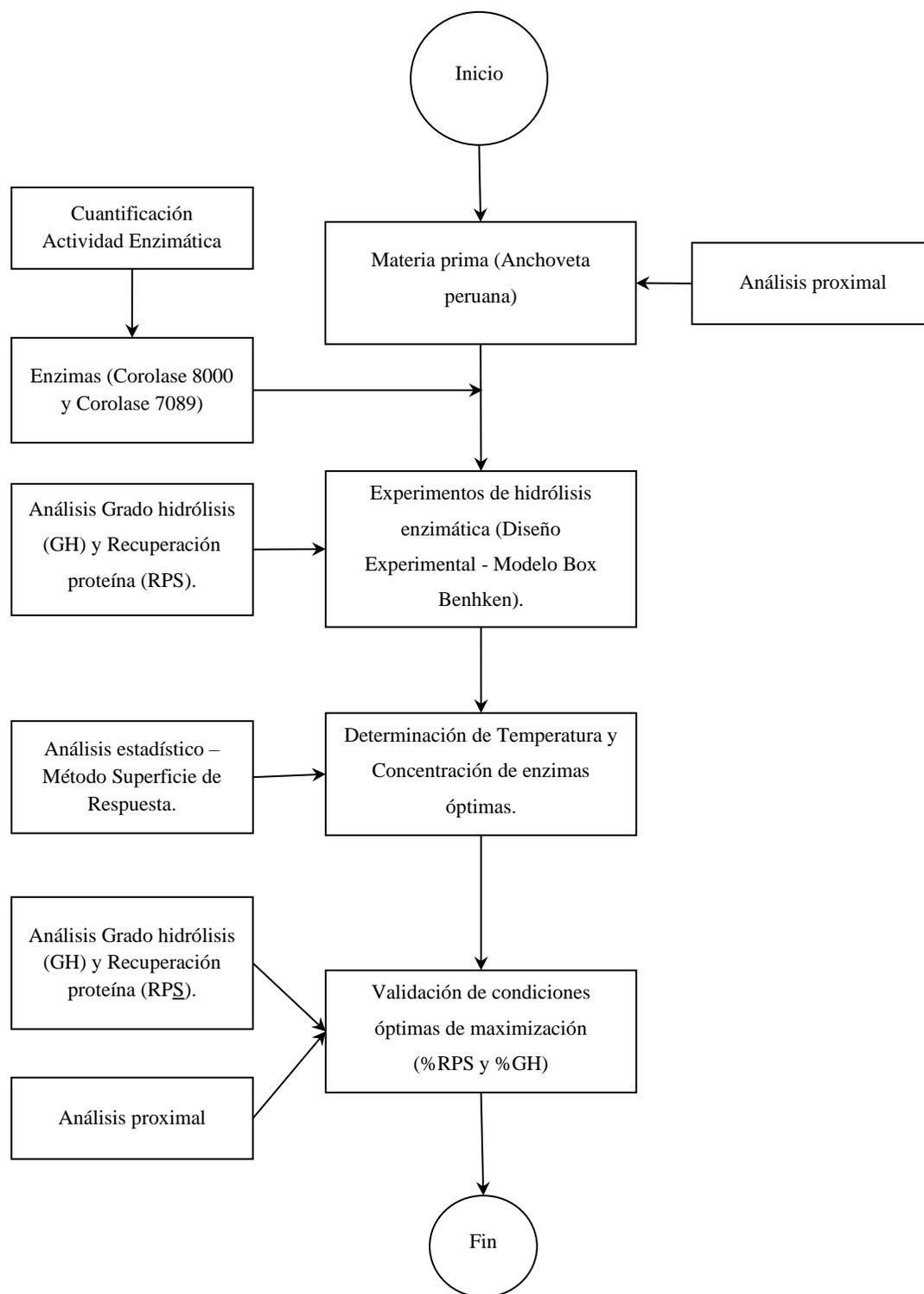


Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la presente investigación.

2.2. Material biológico

2.2.1. Materia prima

La materia prima Anchoveta peruana en etapa adulta con tamaño mayor de 12 cm (datos de ictiometría otorgada por el Laboratorio de Calidad e Investigación de COPEINCA-Chancay), fue adquirida de una fuente comercial de pesca artesanal local en el mes de diciembre de 2021. La muestra fue lavada cuidadosamente y almacenada en una congeladora a -18 °C para los posteriores experimentos de hidrólisis enzimática.

La composición química de la materia prima se determinó por el contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína (análisis proximal) y de acuerdo al porcentaje de proteína cruda se determinaron las concentraciones de enzimas en los posteriores experimentos.

El análisis proximal también se realizó para el producto hidrolizado líquido obtenido en la última fase del estudio, donde se realizó la validación de las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática.

2.2.2. Enzimas comerciales

El proceso de hidrólisis enzimática de proteína de anchoveta peruana se realizó con la acción conjunta de dos (02) proteasas comerciales las cuales se detallan en la Tabla 10, estas enzimas fueron otorgadas por el Laboratorio de Calidad e Investigación de COPEINCA-Chancay para los fines del estudio. Las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 (AB Enzymes) son concentrados enzimáticos microbianos (endo-serina y metalo serina proteasas) de origen fúngico (Termocolina de *Trichoderma reesei*) y bacteriano (*Bacillus subtilis*), respectivamente.

Se cuantificó la Actividad Enzimática de estas proteasas en condiciones de pH 6.1 (simulando el pH que se utilizó para la hidrólisis de anchoveta peruana) y a distintas temperaturas constantes de incubación en un baño maría (50, 60 y 70 °C), con la finalidad de dilucidar el comportamiento de las enzimas en las posteriores etapas de hidrólisis del sustrato anchoveta peruana. Esta fase del estudio se realizó según la metodología detallada en el apartado 3.3.2.

Tabla 10. Datos de fichas técnicas de proteasas comerciales.

Datos técnicos	Enzimas	
	Enzima 1	Enzima 2
Nombre comercial	Corolase 8000	Corolase 7089
Fabricante	AB Enzymes	AB Enzymes
Nomenclatura (E.C.)	3.4.21.65	3.4.2x.xx
Tipo de enzima	Serina endoproteasa (termomicolina)	Metallo y serina proteasa
Origen	<i>Trichoderma reesei</i> (OGM)	<i>Bacillus subtilis</i>
Rango de temperatura	Hasta 80°C	Hasta 60 °C
Rango de pH	6.0 - 10.0	5.5 - 9.0
Actividad Enzimática declarada	100.000 BPU/g	840 UHb/g
Densidad	~1.10 g/ml	~1.15 g/ml
Concentración típica recomendada	0.1 - 2.0%	0.01 - 0.5%

Fuente: Elaboración propia a partir de la información de AB Enzymes (Anexo 1).

2.2.3. Proceso de hidrólisis enzimática

Todos los experimentos de hidrólisis detallados en la Tabla 9 se realizaron en un bioreactor de 3L (Marca Aplikkon – modelo Ez2-control). Previamente, la materia prima se descongeló a temperatura ambiente (25°C) durante aproximadamente 6 horas. Posteriormente se trituró manualmente y se mezcló con agua destilada en una dilución de sustrato de 1.5 (kg pescado/L agua), basado en la metodología empleada por Sifuentes-Penagos *et al.* (2018). Los experimentos se realizaron en batch con un peso total de 830 g de mezcla de reacción que consistió en 500 g de pescado triturado y 330 ml de agua destilada.

La reacción de hidrólisis se realizó sin ajuste inicial del pH con un valor de 6.2 ± 0.2 (pH de la mezcla de Anchoqueta peruana y agua), y con una velocidad de agitación constante de 200 rpm durante un tiempo total de 120 minutos. Previamente la mezcla de reacción se precalentó hasta la temperatura específica del experimento en un equipo de baño maría y se añadió al vaso del biorreactor, donde se estabilizó la temperatura y se inició la hidrólisis adicionando las concentraciones de ambas enzimas como se indica en las condiciones de la Tabla 9. La temperatura se mantuvo constante mediante el uso de una faja de calentamiento equipado en el biorreactor, mientras que el pH no se ajustó a lo largo del proceso.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis, el hidrolizado se filtró a través de una gasa simple para separar las espinas y residuos, y se realizó la inactivación enzimática a una temperatura de $86 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos en un equipo de baño maría.

Se tomó una muestra inicial de la mezcla de reacción antes de adicionar las enzimas y otra posterior al proceso de hidrólisis, estas muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante (fracción soluble). Las muestras de hidrolizado entero y su fracción soluble se almacenaron a -18°C para posteriores análisis.

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Caracterización de materia prima y productos

La caracterización fisicoquímica de la materia prima Anchoveta se realizó mediante la determinación del contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína cruda según los procedimientos estandarizados del Laboratorio de Calidad e Investigación (Copeinca – Sede Chancay), los cuales están basados en los siguientes métodos:

- Determinación de Humedad: Referencia NTP 204.030:1985 (INDECOPI, 2010).
- Determinación de grasa extraíble: Referencia NTP 204.033:1985 (INDECOPI, 2010).
- Determinación de Cenizas: Referencia AOAC 7009 (AOAC,1984).
- Determinación de proteína cruda: Referencia Método Kjeldahl (AOAC, 1995).

Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

2.3.2. Cuantificación de actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática proteasa (AEP) de las enzimas comerciales se utilizó el método de Cuantificación de Actividad Proteasa utilizando Caseína como Sustrato (Cupp-Enyard, 2008), con modificaciones para simular las condiciones de pH en la cual se realiza la hidrólisis del pescado (pH ~6.1). Se empleó un Buffer Fosfato (pH 6.1) (Mohan, 2006) en la preparación de la solución de caseína 0.65% p/v. Los ensayos se realizaron con una dilución de enzimas 1:4000 (v/v) durante 10 minutos a las temperaturas de 50, 60 y 70 °C. La curva de calibración se elaboró con el aminoácido L-tirosina. La actividad enzimática se definió con la unidad (U) como la cantidad de Tirosina-equivalentes (μmol) liberados de la caseína por minuto en las condiciones específicas del ensayo (Anexo 2). Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.3. Determinación del Grado de Hidrólisis (%GH)

Para determinar el Grado de Hidrólisis en muestras de hidrolizado (fracción soluble) se empleó el método de ortoftaldehído (OPA) (Nielsen *et al.*, 2001) y se realizó el cálculo del Grado de Hidrólisis según Guo *et al.* (2019). Como Blanco se utilizó una muestra inicial recolectada previamente a la adición de las enzimas en el experimento de hidrólisis enzimática. La metodología se detalla en el Anexo 3. Los análisis se realizaron por triplicado.

2.3.4. Determinación de la Recuperación de Proteína soluble (%RPS)

La recuperación de proteína se determinó según Sifuentes-Penagos *et al.* (2018), como una relación del nitrógeno recuperado en la fracción soluble entre el nitrógeno total del hidrolizado. El contenido de nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1995) por triplicado y para determinar el Porcentaje de Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%RPS = \frac{\%N \text{ total en la fracción soluble}}{\%N \text{ en hidrolizado}} \times 100$$

2.4. Análisis estadístico

Los datos recolectados de las respuestas del Diseño Experimental Modelo Box-Benhken aplicado en este estudio fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para esto se empleó el Software estadístico STATISTICA 10. Se aplicó el método de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización de los parámetros de estudio mediante el Perfil de Deseabilidad Compuesto donde se determinaron los valores de maximización de las respuestas.

CAPITULO III:

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización fisicoquímica de la materia prima

La composición fisicoquímica proximal de la materia prima Anchoveta peruana que se utilizó en este estudio se muestra en la Tabla 11. Los valores de proteína cruda y humedad de $17.46 \pm 0.31\%$ y $75.82 \pm 0.23\%$, respectivamente, fueron similares a los reportados por otros autores. Cabe mencionar que la materia prima tuvo un elevado porcentaje de pesca adulta, es decir, con ejemplares de longitud mayor a 12 cm.

Resultados distintos a los observados fueron obtenidos por Sifuentes-Penagos *et al.* (2018) cuya materia prima tuvo un contenido de proteína cruda de $13.86 \pm 0.14\%$ y humedad de $77.65 \pm 0.15\%$; sin embargo, los autores mencionaron que la composición proximal del pescado varía según condiciones fisiológicas como la edad, sexo, estadio sexual y la temporada del año, mientras que Fonseca-Rodríguez y Chavarría-Solera (2017) mencionaron que también pueden influenciar la zona de pesca y el tipo de alimentación.

Tabla 11. Composición química proximal de la Anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) utilizada en los experimentos de hidrólisis enzimática.

Componente	Composición (% en base húmeda)				
	Presente estudio	Roldán <i>et al.</i> (2021)	Sifuentes-Penagos <i>et al.</i> (2018)	Ordoñez y Hernández (2014)	Pandia <i>et al.</i> (2013)
Proteína cruda	17.46 ± 0.31	17.21 ± 0.12	13.86 ± 0.14	18.40 ± 0.1	16.52 ± 0.40
Humedad	75.82 ± 0.23	75.17 ± 0.11	77.65 ± 0.15	73.50 ± 0.01	71.31 ± 1.56
Ceniza	3.35 ± 0.02	1.29 ± 0.09	2.71 ± 0.01	1.33 ± 0.04	3.37 ± 0.27
Grasa	4.61 ± 0.25	5.63 ± 0.14	5.24 ± 0.15	6.99 ± 0.04	9.39 ± 1.92

* \pm (variación estándar)

3.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La actividad enzimática proteasa (AEP) fue determinada según Cupp-Enyard (2008) sobre la caseína, modificado a pH 6.1 para simular la premezcla de hidrólisis de Anchoqueta. Como se muestra en la Tabla 12, la AEP de Corolase 8000 fue de 825.7 ± 3.5 U/ml y de Corolase 7089 fue de 1049.6 ± 138.1 U/ml a 60°C .

Tabla 12. Actividad enzimática (U*/ml) de las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 a pH=6.1 y distintas temperaturas de incubación (50, 60 y 70°C).

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Actividad Enzimática (U/ml)	
	Enzima 1 - Corolase 8000	Enzima 2 - Corolase 7089
50	516.8 ± 53.5	1098.3 ± 32.5
60	827.5 ± 3.5	1049.6 ± 138.1
70	1168.8 ± 130.1	452.02 ± 13.3

*U: unidad de actividad enzimática definida como la cantidad de Tirosina-equivalentes (μmol) liberados de la caseína por minuto en las condiciones específicas del ensayo. \pm Intervalo de confianza (IC) de 95%.

Mediante el método utilizado en este trabajo, Aspevik *et al.* (2016) evaluaron la AEP de distintas enzimas comerciales a 50°C con pH 6.5, entre ellas Alcalase 2.4L (1.4 ± 0.2 U/mg enzima), Neutrase 0.8L (0.6 ± 0.06 U/mg enzima) y Corolase 7089 (1.0 U/mg de enzima), esta última concuerda con el resultado de este estudio, donde se obtuvo 1.1 U/mg de enzima a 50°C y pH 6.1. Así también, Joung *et al.* (2018) reportaron la actividad enzimática específica de varias proteasas comerciales como Alcalase AF 2.4L (14.0 ± 0.66 U/mg proteína), Neutrase 0.8L (1.72 ± 0.02 U/mg proteína), Flavourzyme 500MG (2.38 ± 0.02 U/mg proteína), entre otras. Asimismo, Kristinsson y Rasco (2000) reportaron la AEP de Alcalase 2.4L (670167.9 AzU/g enzima), Flavourzyme (59641.3 AzU/g enzima), Corolase 7089 (11521.3 AzU/g enzima) y un extracto enzimático digestivo de *Salmo salar* (salmón) (1211.0 AzU/g enzima). No se encontró literatura con información relacionada a Corolase 8000, por lo que es una enzima poco explorada.

En otras investigaciones, Rahman *et al.* (2018) reportaron una AEP de 60.5 U/ml en un concentrado enzimático obtenido de *Bacillus sp.*; mientras que Park *et al.* (2018) reportaron una AEP de 1.7 U/ml en un extracto enzimático de *Pseudoalteromonas*

arctica. Asimismo, Dhillon *et al.* (2017) reportaron que el extracto enzimático de *Bacillus subtilis* PE-11 presentó AEP de 486 U/ml en un medio que contenía caseína. Es importante considerar que estas últimas investigaciones se realizaron con extractos enzimáticos microbianos parcialmente purificados y mostraron valores inferiores en comparación con los reportados en este trabajo, esto debido a que las enzimas comerciales son producidas y purificadas bajo condiciones óptimas, por lo que tienen mayores rendimientos y estabilidad.

Cabe mencionar que la actividad enzimática se expresa de acuerdo al método analítico utilizado, por ello se pueden encontrar valores de actividad expresados en unidades Anson (AU), de hemoglobina (U_{Hb}), azocol (azoU) o de caseína (U), entre otros (Aspevik *et al.*, 2016); debido a esto es complicado realizar una comparación adecuada de los resultados reportados por otros autores.

En la Figura 7, se observa que la temperatura tuvo una influencia importante sobre la AEP de ambas enzimas. Corolase 7089 se mantuvo relativamente estable a 50 °C y 60 °C, pero a 70 °C disminuyó drásticamente su AEP en un 60%. Mientras que Corolase 8000 tuvo un comportamiento positivo respecto al incremento de la temperatura, ya que su AEP aumentó 2.3 veces su valor entre 50 °C a 70 °C; esto coincide con la información otorgada en las fichas técnicas de ambas proteasas (Tabla 10), donde se indica que Corolase 7089 presenta actividad hasta los 60°C, y Corolase 8000 hasta los 80°C al ser termoestable.

Las proteasas alcalinas de origen bacteriano y fúngico, como Corolase 7089 y Corolase 8000, presentan una actividad óptima en un rango de temperatura entre 50 °C y 70 °C (Sharma *et al.*, 2019), y distintas proteasas comerciales de origen microbiano tienen una temperatura máxima de actividad entre 55 °C y 70°C, entre ellos, Alcalase 2.4L (*B. licheniformis*), Esperase (*B. lentus*), Proleather (*Bacillus sp.*) y Protease P (*Aspergillus niger*) presentan actividad a una temperatura máxima de 65°C, 55 °C, 70°C y 60°C respectivamente; mientras que otras enzimas presentan actividad a temperaturas de hasta 90 °C, tales como, Durazym (*Bacillus sp.*, OMG) y Neutrased (*B. amyloliquefaciens*) que tienen actividad hasta 80°C, y Novozyme 3403 (*B. licheniformis*) que hasta los 90°C (Razzaq *et al.*, 2019). En general, las proteasas

alcalinas maximizan su actividad en presencia de iones metálicos tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} ; teniendo este primero una importante acción sobre el aumento de la termoestabilidad, debido a que reducen la desnaturalización térmica y juegan un rol protector del sitio activo de la enzima a mayores temperaturas (Velooralappil *et al.*, 2013). Así también, los avances en ingeniería genética y proteómica han permitido desarrollar nuevas enzimas termoestables (Li *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 1998).

Según la Tabla 12, la temperatura de 60°C es la más adecuada para que ambas enzimas realicen el proceso catalítico de la anchoveta peruana simultáneamente sin afectar su AEP. Sin embargo, esto es un alcance preliminar de la temperatura óptima, ya que los resultados fueron obtenidos sobre el sustrato caseína, mientras que el comportamiento de estas proteasas sobre la anchoveta peruana podría ser distinto, al tratarse de un sustrato más complejo.

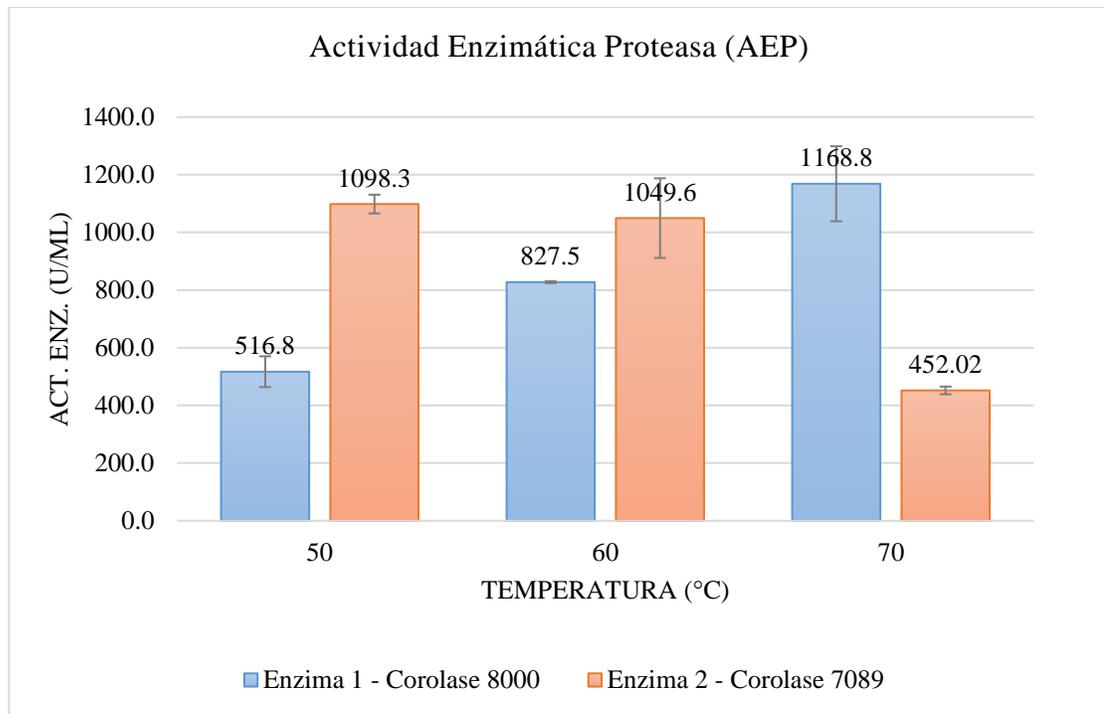


Figura 7. Actividad Enzimática Proteasa (AEP) de Corolase 8000 y Corolase 7089 sobre el sustrato caseína en el rango de temperaturas de 50°C - 70°C a pH 6.1 durante 10 minutos de incubación.

3.3. Hidrólisis enzimática de Anchoveta

Los resultados de los experimentos del diseño factorial Box-Benhken se muestran en la Tabla 13. Los mayores porcentajes de Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH) se lograron en el experimento N° 10 realizado con 1.5% de Enzima 1 (Corolase 8000), 1.2% de Enzima 2 (Corolase 7089) y 50°C, alcanzando un %RPS y %GH de 83.4% y 30.4%, respectivamente. Mientras que los valores más bajos fueron obtenidos en el experimento N° 7 donde se utilizó 0.0% de Corolase 8000, 0.6% de Corolase 7089 y 70°C, logrando un %RPS y %GH de 55.5% y 5.5%. De esta manera se evidencia que las concentraciones de enzimas y la temperatura tuvieron una alta influencia sobre las variables respuesta.

Los puntos centrales presentaron una repetibilidad aceptable; con un valor medio de 75.90% y desviación estándar de $\pm 3.20\%$ para %RPS y de 19.68% y desviación estándar de $\pm 0.77\%$ para %GH.

En la Figura 8 se muestra la Carta de Pareto de efectos estandarizados para el modelo matemático. Se observa que las variables estadísticamente significativas fueron la Enzima 1 (Corolase 8000) y la Temperatura, mientras que la Enzima 2 (Corolase 7089) no mostró significancia para ninguno de las respuestas. Es así que las variables significativas (valor $p < 0.05$) para el %RPS fueron “Enzima 1(L)”, “Enzima 1(Q)” y “Temperatura(L)”; y para el %GH fueron “Enzima 1(L)”, “Enzima 1(Q)”, “Temperatura(L)” y la interacción “Enzima 1 x Enzima 2”. Los modelos matemáticos se ajustaron de manera confiable a las variables en estudio, mostrando Coeficientes de Determinación de 95.5% y 97.7% para %RPS y %GH, respectivamente (Tabla 14). Sin embargo, se retiraron las variables no significativas (valor $p > 0.05$) para simplificar el modelo matemático.

Tabla 13. Resultados experimentales del modelo factorial Box-Benhken para la hidrólisis enzimática de Anchoveta.

Experimentos	Variables experimentales			Variables respuesta	
	Enzima 1 (%)	Enzima 2 (%)	Temperatura (°C)	Recuperación Proteína Soluble (%RPS)	Grado Hidrólisis (%GH)
1	0.0	0.0	60.0	56.65	6.04
2	3.0	0.0	60.0	79.82	22.43
3	0.0	1.2	60.0	63.98	17.52
4	3.0	1.2	60.0	79.82	19.14
5	0.0	0.6	50.0	70.26	18.15
6	3.0	0.6	50.0	81.71	24.51
7	0.0	0.6	70.0	55.50	5.45
8	3.0	0.6	70.0	74.85	19.14
9	1.5	0.0	50.0	82.89	29.01
10	1.5	1.2	50.0	83.38	30.39
11	1.5	0.0	70.0	66.81	14.58
12	1.5	1.2	70.0	66.15	17.29
13	1.5	0.6	60.0	75.34	19.82
14	1.5	0.6	60.0	79.34	20.36
15	1.5	0.6	60.0	73.01	18.85

Los resultados de hidrólisis de la anchoveta difieren con los observados respecto a la actividad (AEP) de las enzimas comerciales a distintas temperaturas sobre la caseína (Figura 7). En el caso de Corolase 8000, tuvo un mayor efecto sobre la hidrólisis a 50 °C, sin embargo, a esta temperatura mostró su menor AEP, siendo 70°C su temperatura más óptima con la caseína. Por otro lado, el hecho de que solo la Enzima 1 (Corolase 8000) tuviera un efecto significativo sobre las variables respuesta demuestra que esta proteasa tiene mayor afinidad con la anchoveta peruana, por lo que es más compatible para la hidrólisis de este sustrato.

Distintas enzimas se pueden desempeñar de manera diferente sobre un mismo sustrato bajo las mismas condiciones de hidrólisis, esto explica la mayor afinidad y efecto que tuvo Corolase 8000 sobre la anchoveta peruana, en comparación con Corolase 7089 que no tuvo un efecto significativo para ninguna de las respuestas. Este fenómeno está influenciado por los mecanismos de selectividad enzimática tales como los sitios específicos de escisión, la presencia de cofactores enzimáticos, el tipo de sustrato y la naturaleza estructural de las proteínas que definen las condiciones específicas de reacción y la especificidad de la enzima sobre su sustrato (Butré *et al.*, 2014; Kanu *et al.*, 2009; Sbroggio *et al.*, 2016).

En el estudio comparativo de Roldán *et al.* (2021) se observó que la hidrólisis fue más eficiente con la enzima Protex 6L que con Corolase H-pH, Corolase 7089 y Dresenzyme en la hidrólisis de anchoveta peruana entera bajo las mismas condiciones. Por otra parte, Aspevik *et al.* (2016) determinaron que las enzimas Alcalase 2.4L, Promod 71L y Protex 7L fueron más eficientes que Neutrased 0.8L y Corolase 7089 en la hidrólisis de proteínas de Salmón (*Salmo salar*). Así también, Herpandi *et al.* (2012) demostraron que la enzima Alcalase 2.4L presentó la mayor actividad catalítica, seguida por Protamex, Flavourzyme 500MG y Neutrased 1.5MG en la hidrólisis de proteínas del Bonito (*Katsuwonus pelamis*); asimismo Alcalase 2.4L tuvo mejores rendimientos que Protamex, Neutrased, Flavourzyme y Tripsina en la hidrólisis de vísceras esturión persa (*Acipenser persicus*) (Ovissipour *et al.*, 2012).

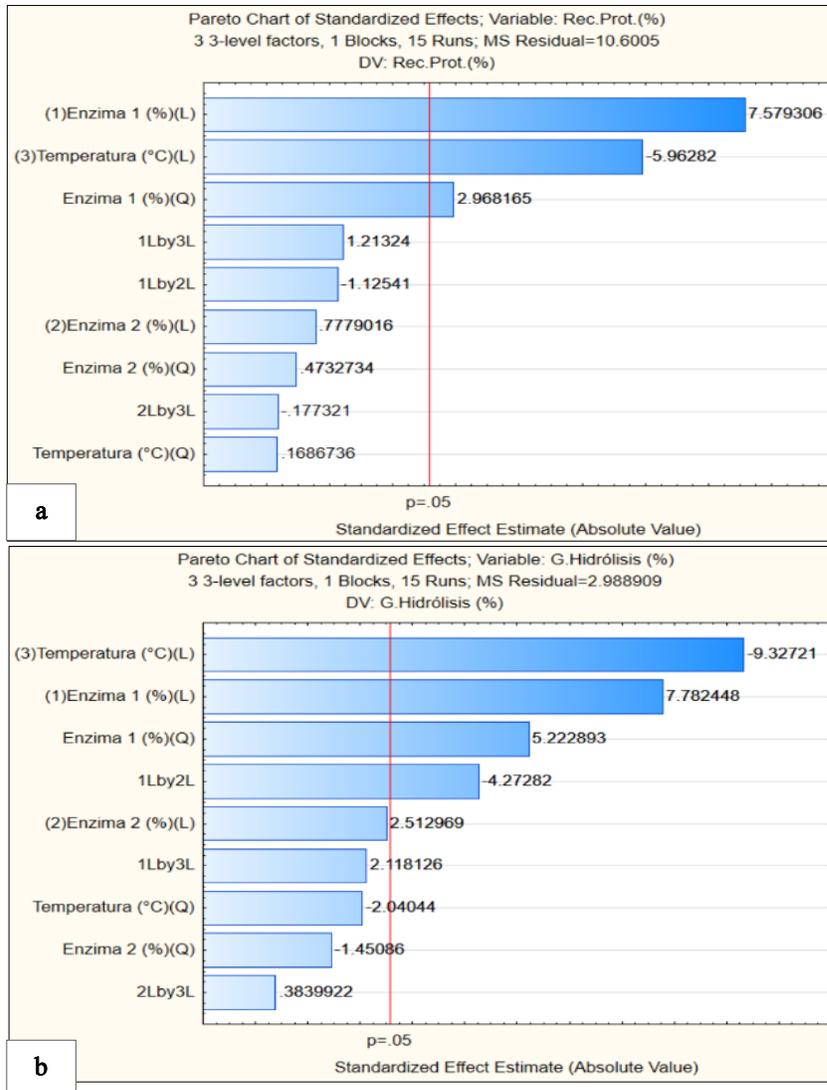


Figura 8. Carta de Pareto para las variables respuesta en la Hidrólisis de Anchoveta. a) Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y b) Grado de Hidrólisis (%GH).

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables respuesta Recuperación de Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH) con el modelo no ajustado.

Factor	Recuperación de Proteína Soluble (%RPS)					Grado de Hidrólisis (%GH)				
	Suma Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (df)	Media de Cuadrados (MS)	Valor F	Valor p	Suma Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (df)	Media de Cuadrados (MS)	Valor F	Valor p
Enzima 1 (L)	608.955	1	608.955	57.446	0.001*	181.028	1	181.028	60.566	0.001*
Enzima 1 (Q)	93.391	1	93.391	8.810	0.031*	81.533	1	81.533	27.279	0.003*
Enzima 2 (L)	6.415	1	6.415	0.605	0.472	18.875	1	18.875	6.315	0.054
Enzima 2 (Q)	2.374	1	2.374	0.224	0.656	6.292	1	6.292	2.105	0.207
Temperatura (L)	376.904	1	376.904	35.555	0.002*	260.026	1	260.026	86.997	0.000*
Temperatura (Q)	0.302	1	0.302	0.028	0.873	12.444	1	12.444	4.163	0.097
Enzima 1 x Enzima 2	13.426	1	13.426	1.267	0.312	54.568	1	54.568	18.257	0.008*
Enzima 1 x Temperatura	15.603	1	15.603	1.472	0.279	13.410	1	13.410	4.486	0.088
Enzima 2 x Temperatura	0.333	1	0.333	0.031	0.866	0.441	1	0.441	0.147	0.717
Error	53.003	5	10.601			14.945	5	2.989		
Suma Cuadrados Total	1168.733	14				651.269	14			
Coef. Det. (R ²)	0.955					0.977				

*: Valor p<0.05;

(L): lineal; (Q): Cuadrático.

3.3.1. Efectos sobre la Recuperación de Proteína Soluble (%RPS)

El %RPS está expresado como la relación entre el contenido de proteína en el hidrolizado y en su fase soluble recuperada por centrifugación, y tuvo valores entre 55.5% y 83.4%. Según el análisis de varianza (ANOVA), las variables Enzima 1 (Corolase 8000) y Temperatura tuvieron un efecto estadísticamente significativo (valor $p < 0.05$) sobre la %RPS con un Coeficiente de Determinación (R^2) de 93.88% (Tabla 15). Los efectos estimados de las variables sobre el %RPS mostrados en la Tabla 16 indicaron que la variable más influyente fue la concentración de Enzima 1, mientras que la Temperatura tuvo un efecto negativo, es decir, que el incremento de la temperatura reduce el %RPS.

El efecto positivo de la concentración de enzimas sobre el %RPS fue también observado en la hidrólisis de Anchoqueta peruana entera con Protamex, donde se alcanzó un %RPS máximo de 75.3% en 120 minutos de hidrólisis (Sifuentes-Penagos *et al.*, 2018). Así también, en la hidrólisis de subproductos de Salmón (*Salmo salar*) con distintas proteasas comerciales con un %RPS máximo de 71% (Aspevik *et al.*, 2016); de igual forma en la hidrólisis de residuos de caballa con Alcalase 2.4L donde se obtuvo %RPS de 76.3% (Ramakrishnan *et al.*, 2013); en la hidrólisis de esturión pérsico con Alcalase 2.4L donde se alcanzó un %RPS de 83.6% bajo condiciones óptimas (Ovissipour *et al.*, 2012); en la hidrólisis de vísceras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) con Alcalase 2.4L bajo condiciones óptimas con un %RPS de 85% (Ovissipour *et al.*, 2011); y en la hidrólisis de anchoqueta (*Engraulis japonicus*) con una combinación de Flavourzyme, Protamex y Alcalase 2.4L bajo condiciones óptimas, obteniendo un %RPS de 87.5% (He *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos están dentro de los porcentajes observados en otros estudios, sobre todo aquellos llevados a cabo con Alcalase 2.4L sobre proteínas de pescado, lo que indica que Corolase 8000 tiene una capacidad catalítica comparable con otras enzimas de alto rendimiento para hidrolizar estos sustratos.

Tabla 15. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS).

Factor	Suma Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (df)	Media de Cuadrados (MS)	Valor F	Valor p
Enzima 1 (L)	608.955	1	608.955	76.652	0.000*
Enzima 1 (Q)	91.533	1	91.533	11.522	0.008*
Enzima 2(L)	6.415	1	6.415	0.807	0.392
Temperatura (L)	376.904	1	376.904	47.442	0.000*
Enzima 1 x Enzima 2	13.426	1	13.426	1.690	0.226
Error	71.500	9	7.945		
Suma Cuadrados Total	1168.733	14			
Coef. Det. (R ²)	0.9388				

Tabla 16. Efectos estimados, significancia y coeficientes del modelo ajustado para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS).

Factor	Efecto	Error estándar	t(5)	Valor p	Coefficiente de regresión (CR)	Error estándar (CR)
Media	71.973	0.753	95.544	0.000*	100.054	6.381
Enzima 1 (L)	17.449	1.993	8.755	0.000*	13.640	2.260
Enzima 1 (Q)	4.952	1.459	3.394	0.008*	-2.201	0.648
Enzima 2(L)	1.791	1.993	0.899	0.392	4.546	2.877
Temperatura (L)	-13.728	1.993	-6.888	0.000*	-0.686	0.100
Enzima 1 x Enzima 2	-3.664	2.819	-1.300	0.226	-2.036	1.566

En la Tabla 16 se muestran también los coeficientes de regresión de cada variable para el %RPS, obteniéndose el siguiente modelo matemático:

$$\%RPS = 100.054 + 13.640 (\text{Enzima 1}) - 2.201 (\text{Enzima 1})^2 + 4.546 (\text{Enzima 2}) - 0.686 (\text{Temperatura}) - 2.036 (\text{Enzima 1 x Enzima 2})$$

Siendo

Enzima 1: Concentración de Corolase 8000 (%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100); Enzima 2: Concentración de Corolase 7089 (%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100); Temperatura: temperatura de hidrólisis (°C).

El comportamiento de las variables de estudio sobre el %RPS se puede observar en los gráficos de la Figura 9. Respecto a la influencia de cada enzima (Figura 9-a), la enzima 1 (Corolase 8000) tuvo una evidente influencia sobre el %RPS, conforme incrementa la concentración se obtienen mayores %RPS; alcanzando valores mayores al 80% aún en ausencia de la enzima 2 (Corolase 7089); sin embargo, en ausencia de la enzima 1 (Corolase 8000) no se supera el 60% de %RPS independientemente de la concentración de enzima 2 (Corolase 7089). Así también, en ausencia de ambas enzimas y a 60°C se alcanza un %RPS cercano a 60%, lo cual puede ser atribuido a enzimas endógenas en el pescado o a la presencia de proteínas solubles sarcoplasmáticas, gelatina o aminoácidos libres que se solubilizan en el medio (Aspevik *et al.*, 2016).

Por otra parte, el efecto de la temperatura sobre la Enzima 1 (Corolase 8000) se muestra en la Figura 9-b. El desempeño de la enzima 1 (Corolase 8000) fue reducido por el incremento de temperatura, observándose que a temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$ se alcanza un %RPS sobre el 80%; no obstante, al aumentar la temperatura a 70°C se reduce a valores cercanos al 70% aproximadamente. Esto contradice el comportamiento de Corolase 8000, que al ser una enzima termoestable presentó su máxima actividad enzimática (1168 ± 130.1 U/ml) a 70°C y su menor actividad (516.8 ± 50.3 U/ml) a 50°C sobre la caseína (Tabla 12).

Para el caso de la Enzima 2 (Corolase 7089), en la Figura 9-c se muestra un efecto negativo de la temperatura similar a la Enzima 1 (Corolase 8000); el %RPS se mantiene cercano al 80% indiferente de la concentración de Corolase 7089 cuando se aplica una temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$, lo que demuestra que la Enzima 2 (Corolase 7089) no tiene una influencia significativa para el proceso de hidrólisis independiente de la temperatura.

Se conoce que la temperatura de hidrólisis tiene un rol importante sobre la actividad catalítica de las proteasas y su capacidad de solubilizar las proteínas, normalmente el aumento de la temperatura promueve la recuperación de estas; esto se observó en la hidrólisis de vísceras de esturión con Alcalase 2.4L en un rango de $35\text{-}55^{\circ}\text{C}$ (Ovissipour *et al.*, 2009). No obstante, este efecto positivo

depende de la temperatura óptima de la enzima respecto a su sustrato específico, puesto que al superar el valor óptimo la temperatura perjudica la recuperación de proteínas; como se demostró en la hidrólisis de pescado *Restrineobola argénte*a con Alcalase 2.4L, donde el %RPS tuvo un incremento significativo al aumentar la temperatura hasta 56°C; sin embargo, esta se redujo por sobre los 58°C, lo que se atribuyó a una desestabilización de la enzima y la reducción de su actividad catalítica (Awuor *et al.*, 2017). De igual manera en la hidrólisis de subproductos de pez gato (*Pangasius hypophthalmus L.*) con SEB-neutral PL, el %RPS tuvo un incremento hasta los 55°C y disminuyó por encima de este nivel (Hien *et al.*, 2022); y en la hidrólisis de residuos de camarón (*Penaeus indicus*) con Alcalase, donde se determinó que la temperatura tuvo un efecto estadísticamente negativo sobre la recuperación de proteínas (Sowmya *et al.*, 2014).

De acuerdo a lo mencionado, la temperatura de hidrólisis tuvo un efecto negativo y afecta a la Recuperación de Proteína cuando se encuentra por encima de su valor óptimo. Es así que para el caso de Corolase 8000 actuando sobre el sustrato anchoveta peruana, la temperatura mostró un efecto negativo ya que su valor óptimo se encontraría por debajo de los 50°C como se muestra en la Figura 9-b y no en el rango experimental aplicado en este estudio (50-70°C).

Según las observaciones, para obtener altos valores de %RPS en la hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana, se debe trabajar a temperaturas cercanas a 50°C con una concentración aproximada del 3.0% de Enzima 1 (Corolase 8000), siendo estadísticamente innecesaria la adición de la Enzima 2 (Corolase 7089), ya que no presenta una influencia importante sobre la variable respuesta.

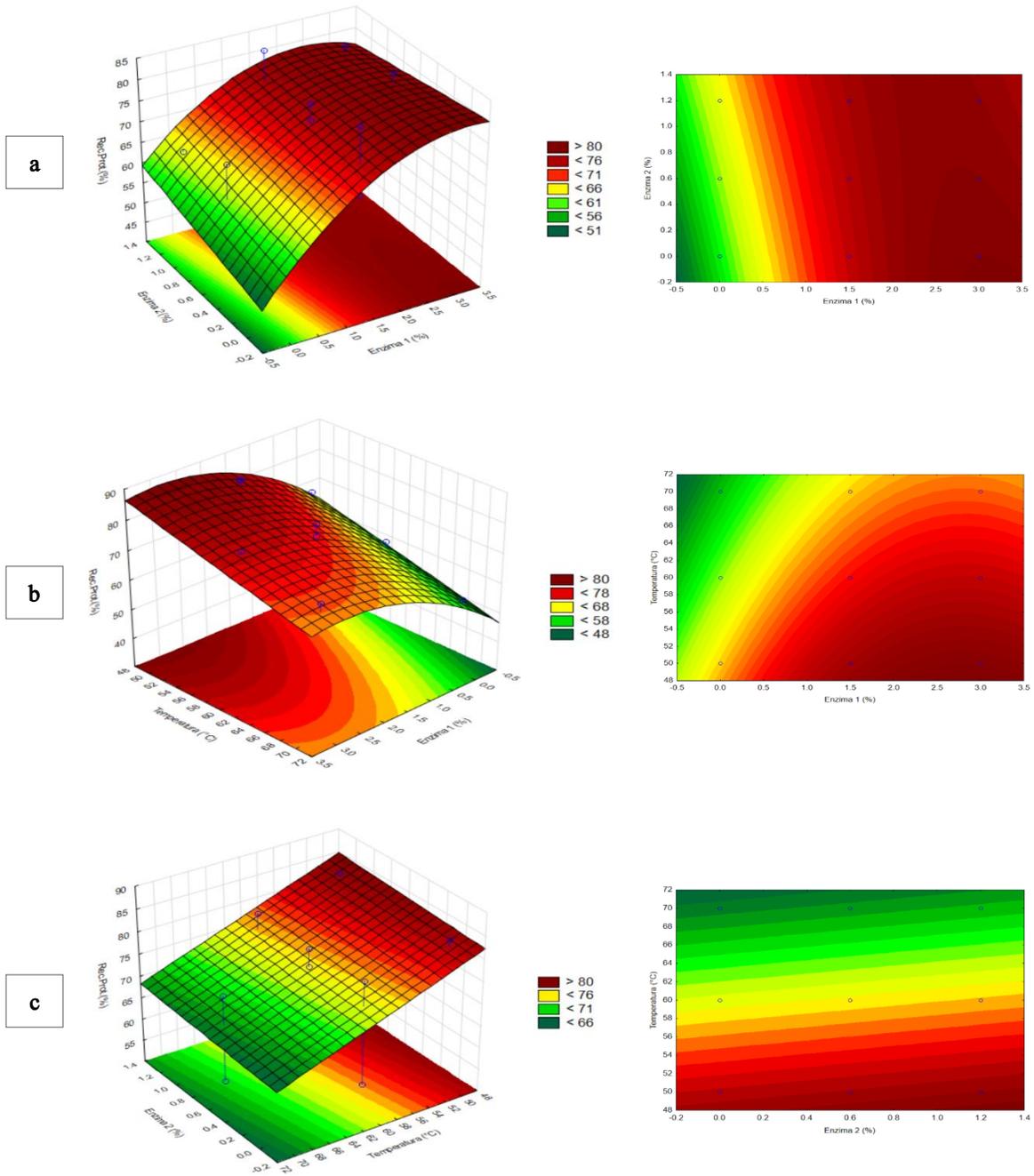


Figura 9. Gráficos de Superficie de Respuesta y Contorno para la variable respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS). a) Interacción Enzima 1 vs Enzima 2 (Temperatura nivel central: 60°C). b) Interacción Enzima 1 vs Temperatura (Enzima 2 nivel central: 0.5%). c) Interacción Enzima 2 vs Temperatura (Enzima 1 nivel central: 1.5%).

3.3.2. Efectos sobre el Grado de Hidrólisis (%GH)

Los resultados de Grado de Hidrólisis (%GH) están expresados como el porcentaje de escisión de los enlaces peptídicos, el cual es utilizado como indicador del progreso de la hidrólisis de las proteínas; en este estudio se demostró que las variables influyeron sobre el %GH y se obtuvieron valores entre 5.45% a 30.39% mediante el método de ortoftaldehído (OPA).

Otros estudios emplearon el método OPA para determinar el %GH; Roslan *et al.* (2014) obtuvieron un grado de hidrólisis de 20.2% en la hidrólisis de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con Alcalase 2.4L; por otro lado, Guo *et al.* (2019) alcanzaron %GH máximos de 34.5%, 44.7% y 24.0% con las enzimas ENMEX Ht, PAL y PF, respectivamente, durante 120 minutos de hidrólisis de pescado *Pterygoplichthys disjunctivus* bajo condiciones óptimas, destacando que los valores de %GH obtenidos en su investigación superaron a los hallados en otros trabajos realizados sobre proteínas de pescado, que típicamente están en el rango de 15% a 40%. Asimismo, también se reportó el %GH sobre sustratos como la proteína de soya y caseína con valores de 33.0% y 37.7% en 2 horas de hidrólisis (Nielsen *et al.*, 2001); y en hidrólisis de suero de leche con pancreatina alcanzando un %GH de 27.2% en 2 horas (Silvestre *et al.*, 2013).

En la Tabla 17 se muestran el análisis de varianza (ANOVA) con las variables significativas para el modelo ajustado con un Coeficiente de Determinación del 92.9%. Para este caso, las variables significativas (valor $p < 0.05$) fueron Enzima 1 (Corolase 8000), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la interacción Enzima 1 x Enzima 2. Mientras que la Enzima 2 (Corolase 7089) no mostró tener una influencia significativa (valor $p > 0.05$) sobre el %GH, lo cual podría estar relacionado a su baja selectividad por el sustrato anchoveta peruana, como fue previamente explicado.

Los efectos estimados se muestran en la Tabla 18. La variable Enzima 1 (Corolase 8000) mostró un impacto positivo, lo que significa que al aumentar su concentración se incrementa el %GH. El grado de hidrólisis dependió directamente de la concentración de enzima y esto fue también reportado en la

hidrólisis de Anchoveta peruana entera con Protamex (Sifuentes-Penagos *et al.*, 2018); en la hidrólisis de residuos de gibelión catla (*Catla catla*), utilizando Alcalase 2.4L (Bhaskar *et al.*, 2008); en la hidrólisis de Anchoveta (*Engraulis japonicus*) con una mezcla de Flavourzyme, Protamex y Alcalase 2.4L (He *et al.*, 2014); y en la hidrólisis de subproductos de tilapia por la enzima Alcalase 2.4L (Roslan *et al.*, 2014), entre otros estudios.

Por otra parte, la temperatura tuvo un efecto negativo respecto al %GH. Este resultado difiere con Ovissipour *et al.* (2009) que reportaron que la temperatura tuvo una influencia positiva sobre el %GH en la hidrólisis de esturión persa (*Acipenser persicus*) con Alcalase 2.4L; asimismo Bhaskar *et al.* (2008) lo reportaron en la hidrólisis de vísceras de Catla (*Catla catla*) con Alcalase.

Tabla 17. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH).

Factor	Suma Cuadrados (SS)	Grados de Libertad (df)	Media de Cuadrados (MS)	Valor F	Valor p
Enzima 1 (L)	181.028	1	181.028	35.210	0.0002*
Enzima 1 (Q)	90.500	1	90.500	17.602	0.0023*
Enzima 2(L)	18.875	1	18.875	3.671	0.0876
Temperatura (L)	260.026	1	260.026	50.575	0.0001*
Enzima 1 x Enzima 2	54.568	1	54.568	10.614	0.0099*
Error	46.273	9	5.141		
Suma Cuadrados Total	651.269	14			
Coef. Det. (R ²)	0.929				

* Valor p < 0.05. Estadísticamente significativo.

Tabla 18. Efectos estimados, significancia y coeficientes del modelo ajustado para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH).

Factor	Efecto	Error estándar	t(5)	Valor p	Coefficiente de Regresión (CR)	Error estándar (CR)
Media	18.188	0.606	30.014	0.000*	40.768	5.133
Enzima 1 (L)	9.514	1.603	5.934	0.000*	12.198	1.818
Enzima 1 (Q)	4.924	1.174	4.195	0.002*	-2.188	0.522
Enzima 2(L)	3.072	1.603	1.916	0.088	8.716	2.314
Temperatura (L)	-11.402	1.603	-7.112	0.000*	-0.570	0.080
Enzima 1 x Enzima 2	-7.387	2.267	-3.258	0.009*	-4.104	1.260

En la Tabla 18 se muestran también los coeficientes de regresión de cada variable para el %GH, obteniéndose el siguiente modelo matemático:

$$\%GH = 40.768 + 12.198 (\text{Enzima 1}) - 2.188 (\text{Enzima 1})^2 + 8.716 (\text{Enzima 2}) - 0.570 (\text{Temperatura}) - 4.104 (\text{Enzima 1 x Enzima 2})$$

Siendo

Enzima 1: Concentración de Corolase 8000 (%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100); Enzima 2: Concentración de Corolase 7089 (%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100); Temperatura: temperatura de hidrólisis (°C).

En la Figura 10 se muestran los gráficos respecto al comportamiento de las variables sobre %GH. En cuanto a la influencia de las concentraciones de enzimas (Figura 10-a), la concentración de la Enzima 1 (Corolase 8000) tuvo un efecto positivo sobre el %GH, caso contrario de la Enzima 2 (Corolase 7089) cuyo efecto fue insignificante. La interacción entre ambas enzimas tuvo un impacto negativo sobre el %GH; al utilizar la concentración máxima de 3.0% de Enzima 1 (Corolase 8000) se alcanzan %GH mayores de 20%, siempre que la concentración de Enzima 2 (Corolase 7089) sea menor de 0.2%; mientras que al aumentar la concentración de Enzima 2 (Corolase 7089), el %GH se reduce a niveles por debajo del 18%. Este fenómeno puede ocurrir por un efecto de competitividad enzimática o por la generación de ciertos productos inhibitorios formados por la Enzima 2 (Corolase 7089) en una primera etapa de la hidrólisis (Valencia *et al.*, 2014), esto podría explicar la reducción de la velocidad de la Enzima 1 (Corolase 8000). Por lo tanto, la actividad catalítica se ve afectada por la presencia e interacción de ambas enzimas y, por ende, el %GH y el %RPS se ven afectados. He *et al.* (2014) observaron una disminución del %GH y la actividad antioxidante del hidrolizado de Anchoqueta (*Engraulis japonicus*) al combinar Flavourzyme con altas concentraciones de Protamex y/o Alcalase 2.4L.

Otra observación importante fue que, en ausencia de Enzima 2 (Corolase 7089), en un rango de concentración de 2.5-3.0% de Enzima 1 (Corolase 8000) se obtiene un %GH mayor al 20%, y fuera de este rango el %GH tiende a decrecer. Esto fue también reportado en la hidrólisis de residuos de langostino (*Penaeus chinensis*) con Devase, donde se redujo drásticamente el %GH al incrementar la concentración de enzima de 2% a 2.5% (Guo *et al.*, 2014); asimismo ocurrió en la hidrólisis de músculo de esturión chino (*Acipenser sinensis*) con un preparado de papaína al incrementar la concentración de enzima por encima del 3% (Noman *et al.*, 2018). Una posible explicación es que en circunstancias de saturación enzimática se rompen la mayoría de los enlaces peptídicos en la primera etapa de hidrólisis, produciendo péptidos y aminoácidos que son poco susceptibles a la hidrólisis e inhiben la velocidad enzimática; por lo tanto, al utilizar concentración de enzimas superiores al valor óptimo se acelera la generación de estos productos

inhibitorios. Es por ello que es importante identificar la concentración de enzima óptima al cual debe limitarse un proceso de hidrólisis, ya que al sobrepasar este valor se perjudica la actividad catalítica, con la finalidad de evitar el aumento de los costos de producción por el sobreconsumo de enzimas a mayor escala.

Por otra parte, en la Figura 10-b se muestra el efecto que tiene la temperatura sobre la Enzima 1 (Corolase 8000); con temperaturas menores de 50 °C se logran obtener %GH superiores al 25% aplicando concentración entre 1.5-3.0%; en este mismo rango de concentración, a temperaturas de 60 °C y 70 °C, el %GH se reduce a valores inferiores al 20% y al 15%, respectivamente, exhibiendo el efecto negativo de las altas temperaturas sobre la hidrólisis de la anchoveta peruana con Enzima 1 (Corolase 8000). Como fue explicado previamente, es posible que la temperatura óptima de Enzima 1 (Corolase 8000) para hidrolizar las proteínas de anchoveta peruana se encuentre por debajo de 50°C y que el rango empleado en este estudio (50-70°C) no fuera el más adecuado.

Con respecto a la Enzima 2 (Corolase 7089), el aumento de la temperatura también tuvo un impacto negativo sobre su actividad catalítica. En la Figura 10-c se muestra que a 60 °C y una concentración máxima de 1.2% (Punto Central Enzima 1: 1.5%) se alcanzan %GH superiores al 25%; mientras que aumentar la temperatura sobre 60 °C y 70 °C, el %GH se reduce por debajo de 25% y 15%, respectivamente. La Enzima 2 (Corolase 7089) es altamente sensible a las temperaturas superiores a 60°C y estos resultados coinciden con los obtenidos sobre el sustrato caseína en condiciones de ensayo (Tabla 12) donde se mostró que esta enzima fue estable hasta los 60°C.

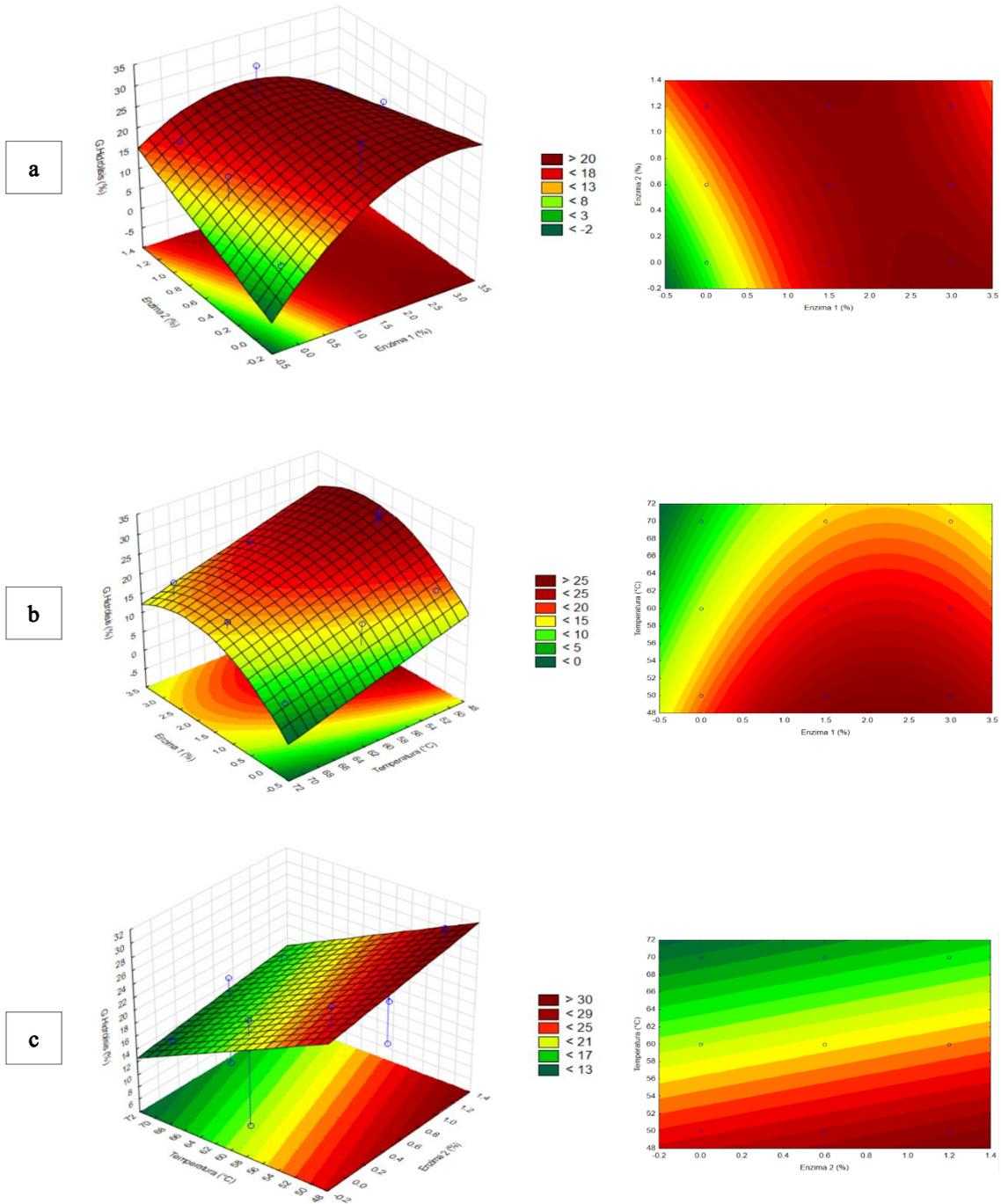


Figura 10. Gráficos de Superficie de Respuesta y Contorno para la variable respuesta Grado de Hidrólisis (%GH). a) Interacción Enzima 1 vs Enzima 2 (Temperatura nivel central: 60°C). b) Interacción Enzima 1 vs Temperatura (Enzima 2 nivel central: 0.5%). c) Interacción Enzima 2 vs Temperatura (Enzima 1 nivel central: 1.5%).

3.4. Optimización de la hidrólisis enzimática de anchoveta

3.4.1. Perfil de deseabilidad y condiciones óptimas

Mediante la herramienta de optimización del software STATISTICA 10 se obtuvo un perfil de deseabilidad compuesto para maximizar las respuestas de %RPS y %GH, tal como se muestra en la Figura 11.

En la Tabla 19 se indican los valores óptimos de Enzima 1 (Corolase 8000), Enzima 2 (Corolase 7089) y Temperatura de hidrólisis, así como los valores predictivos de %RPS y %GH con un valor de deseabilidad de 0.98. Esto significa que hay una alta confiabilidad que las condiciones óptimas para alcanzar los máximos valores de las variables respuesta sean un 3.0% de Enzima 1, ausencia de Enzima 2 (0.0%) y la temperatura de 50°C.

Tabla 19. Valores óptimos experimentales y respuestas pronosticadas de las variables Recuperación Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH).

Valores óptimos - variables experimentales			Valores pronosticados - variables respuesta		Valor de deseabilidad
Enzima 1 (%)	Enzima 2 (%)	Temperatura (°C)	Recuperación Proteína Soluble (%RPS)	Grado Hidrólisis (%GH)	
3.00	0.00	50.00	86.85 ± 5.52	29.16 ± 4.44	0.98

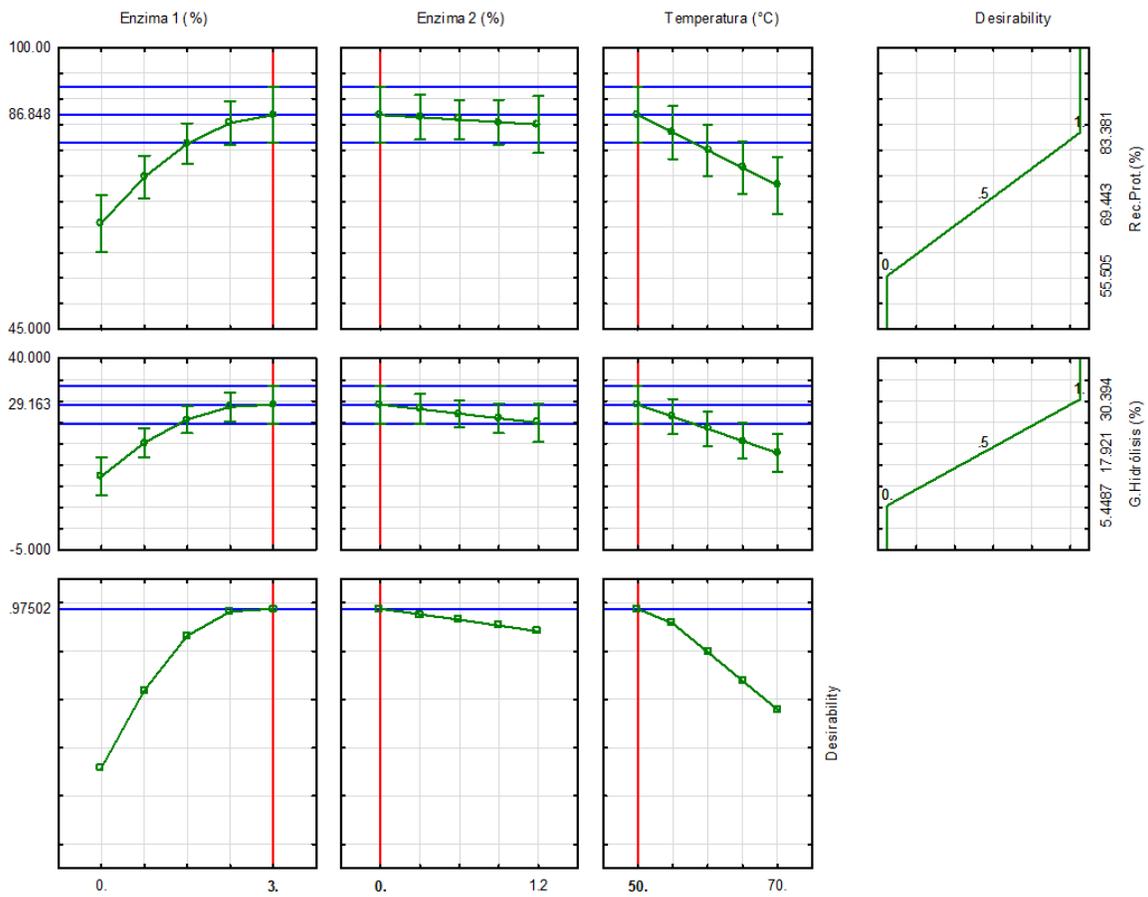


Figura 11. Perfiles de predicción y deseabilidad para las variables respuesta Recuperación Proteína Soluble (%RPS) y Grado de Hidrólisis (%GH).

3.4.2. Validación de condiciones óptimas

En la Tabla 20 se muestran las condiciones de hidrólisis de la anchoveta entera empleadas para la validación experimental del perfil de optimización (maximización) del %RPS y %GH, según los valores óptimos indicados en la Tabla 19.

Tabla 20. Condiciones óptimas de hidrólisis enzimática de Anchoveta entera para la validación experimental.

Factor	Dimensión	Valor
Dilución de sustrato	p/p; pescado (Kg) / Agua (Kg)	1.5
pH (sin ajuste)	-	~6.1
Agitación	rpm	200
Tiempo de hidrólisis	Minutos	180
Temperatura	°C	50
Enzima 1 (Corolase 8000)	%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100.	3.0
Enzima 2 (Corolase 7089)	%; enzima (g) / proteína cruda (g) x 100.	0.0

Los resultados de la validación del modelo de optimización se presentan en la Tabla 21. Los valores de %RPS y %GH obtenidos en la validación se ajustaron a la predicción realizada por el modelo en un intervalo de confianza del 95%. Los resultados demuestran que el modelo matemático fue capaz de predecir el comportamiento y maximizar las variables respuesta en la hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana entera.

Mediante la MSR se determinó que las condiciones óptimas para la hidrólisis de Anchoveta peruana entera con Corolase 8000 fueron con una concentración de enzima de 3.0% a 50°C durante 120 minutos, sin necesidad de utilizar Corolase 7089, y se alcanzó un %GH de 30.9% (método OPA) y un %RPS de 84.3%.

Tabla 21. Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la hidrólisis de Anchoveta entera con Corolase 8000 y Corolase 7089.

Variable respuesta	Predicción (IC 95%)	Validación (IC 95%)
Rec. Prot. (%RPS)	86.9 ± 5.5 %	84.3 ± 0.8 %
Grado de Hidrólisis (%GH)	29.2 ± 4.4 %	30.9 ± 3.6 %

Sifuentes-Penagos *et al.* (2018) emplearon la MSR para optimizar la hidrólisis de *Engraulis ringens* con Protamex, determinando los valores óptimos de concentración de enzima 60 UA/kg proteína, dilución de sustrato de 0.7 kg pescado/kg agua y 60 minutos de proceso, alcanzando un %GH y %RPS de 16.9% y 68.7%, respectivamente. Mientras que He *et al.* (2014) establecieron que las condiciones óptimas para la preparación de un hidrolizado de anchoveta (*Engraulis japonicus*) fueron con una concentración de enzima 3.27% (p/p), 55.4°C y 2.7 horas, alcanzando un %GH de 33.2%, %RPS de 87.5% y una máxima actividad antioxidante de 84.5%.

Por otra parte, See *et al.* (2011) establecieron que las condiciones optimizadas para la hidrólisis de piel de salmón (*Salmo salar*) fueron con 2.5% (v/p) de Alcalase 2.4L a temperatura de 55.3 °C y pH 8.4, logrando un %GH de 77.03% (método de TCA) y %RPS de 89.53%. También, Hou y Li (2011) optimizaron mediante MSR las condiciones de hidrólisis del pescado *Sillago sihama* con una temperatura de 55°C, concentración de enzima de 1.5% y pH 7.5, con lo cual alcanzaron un GH de 20.2% (método ninhidrina) y una RPS de 95.8%. Roslan *et al.* (2014) también emplearon MSR para optimizar la hidrólisis de tilapia

(*Oreochromis niloticus*) y establecieron que un 2.5% de sustrato, 4.0% de Alcalase 2.4L, temperatura de 50° y pH 7.5 fueron las condiciones óptimas para alcanzar un %GH de 25.16% (método OPA) en 120 minutos de proceso. Por último, Guo *et al.* (2014) realizaron la hidrólisis de langostino (*Penaeus chinensis*) en las condiciones óptimas establecidas por MSR de 57 °C, pH 6.5 y 2.0% de Devase, con lo que alcanzaron un %GH máximo de 57.7% (método formol).

En todos los estudios mencionados, los valores experimentales de validación coincidieron con los valores predictivos del modelo matemático, lo que demostró que la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) fue una herramienta eficaz y precisa para la optimización de la hidrólisis de proteínas de pescado.

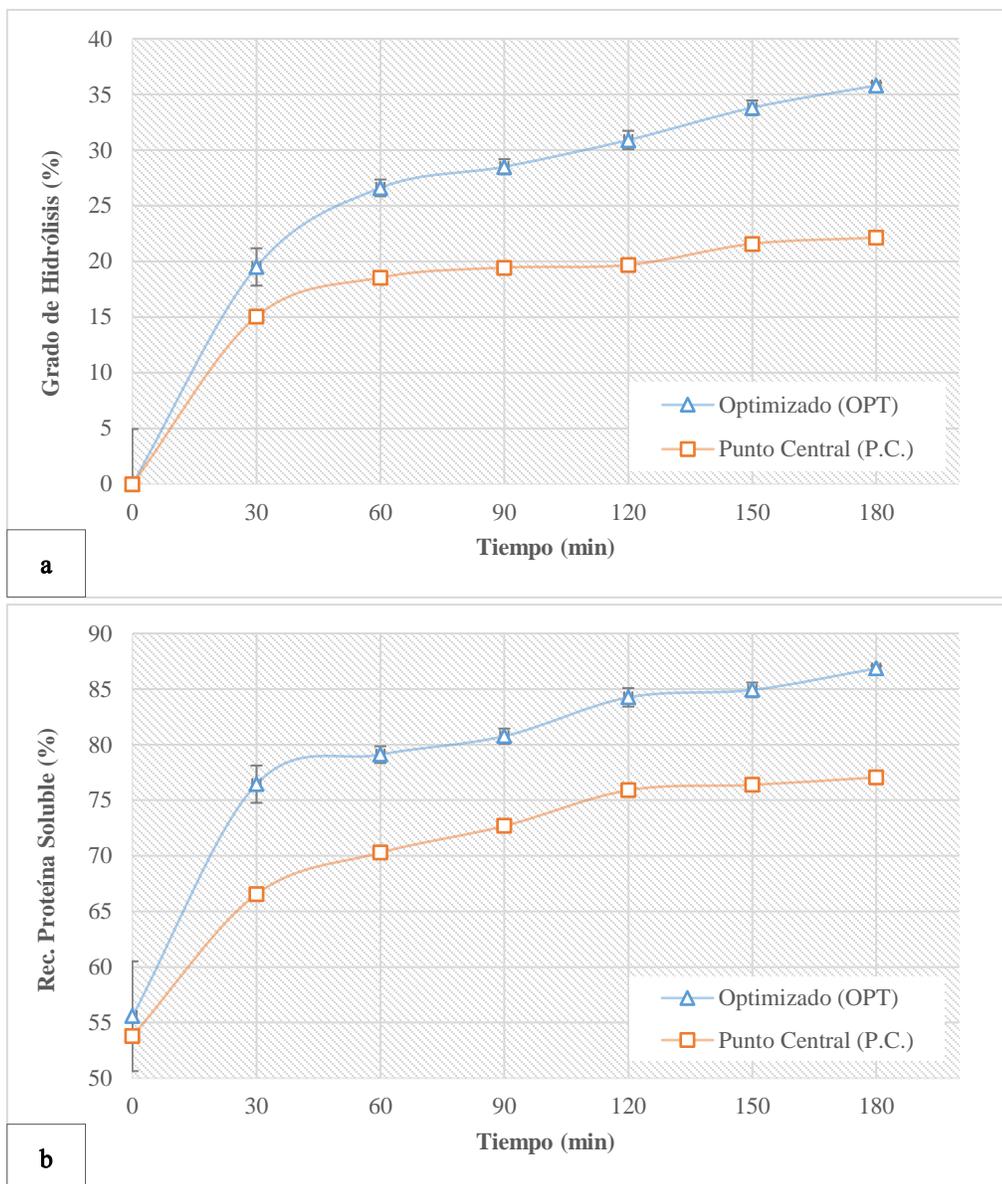


Figura 12. Cinética de la hidrólisis enzimática de Anchoveta en condiciones estándar (P.C.) y optimizadas (OPT). a) Comparación de la variable Grado de Hidrólisis (%GH). b) Comparación de la variable Recuperación Proteína Soluble (%RPS).

En la Figura 12 se muestra la comparación de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas de anchoveta peruana con condiciones optimizadas (OPT) con 3.0% de Enzima 1 (Corolase 8000) a 50°C; y con los puntos centrales experimentales (P.C.) con 1.5% de Enzima 1 (Corolase 8000), 0.6% de Enzima 2 (Corolase 7089) a 60°C. Se observa que OPT presentó una mayor velocidad catalítica dado que en 120 minutos de hidrólisis con P.C. se alcanzaron valores de %GH y %RPS de 19.7% \pm 0.8 y 75.9% \pm 3.2, respectivamente, mientras que con OPT se consiguieron valores similares de 19.5% \pm 1.4 de %GH y 76.4% \pm 1.7 de %RPS en un tiempo menor de 30 minutos. De esta manera, el tiempo de hidrólisis se logró reducir hasta en un 75%, de 120 minutos a 30 minutos, al emplear las condiciones optimizadas OPT de concentración de enzimas y temperatura determinadas en este trabajo.

Por otra parte, se prolongó la reacción de hidrólisis hasta 180 minutos para observar el comportamiento del %GH y %RPS. En el caso del %GH, entre los 120 a 180 minutos hubo un incremento de un 2.5% con P.C. y de 5% con OPT, esto correspondería a un incremento relativo del 12.4% y 15.9% de su valor, respectivamente; mientras que el %RPS solo incrementó un 1.2% para P.C. y 2.6% para OPT, lo que correspondió a un aumento relativo del 1.5% y 3.1% de su valor, respectivamente. Si bien el %GH tuvo una tendencia a seguir incrementando al prolongar la hidrólisis, no pasó lo mismo con el %RPS en la misma magnitud.

El grado de hidrólisis tiene una alta correlación con la recuperación de proteína; por lo tanto, a un alto grado de hidrólisis se obtiene una mayor solubilización y recuperación de estas (Ovissipour *et al.*, 2011). Sin embargo, bajo ciertas condiciones puede ocurrir que un incremento del grado de hidrólisis no necesariamente involucre un aumento significativo de la recuperación de proteínas, esto ocurre porque durante la hidrólisis solo una fracción de las enzimas reaccionan con la parte insoluble del sustrato, mientras que la otra fracción se asocia a proteínas ya solubilizadas (Aspevik *et al.*, 2016). Y también mencionan Sifuentes-Penagos *et al.*, 2018) que a partir de cierto tiempo, la

recuperación de proteínas disminuye de manera gradual, debido a que los péptidos solubles serían atrapados en la fase lipoproteica formada durante la hidrólisis y no se podrían recuperar de manera eficiente en la fase soluble.

Por lo anterior observado, al realizar la hidrólisis de la anchoveta peruana con las condiciones optimizadas no es necesario aumentar el tiempo de hidrólisis sobre 120 minutos ya que esto no involucraría un incremento significativo de %RPS y podría incurrir en mayores gastos energéticos y menor productividad.

En la Tabla 22 se muestra las características fisicoquímicas del producto hidrolizado líquido que se elaboró mediante la hidrólisis de proteínas de anchoveta peruana en condiciones óptimas.

Tabla 22. Composición fisicoquímica del Hidrolizado líquido de Anchoveta entera elaborado en condiciones óptimas de hidrólisis.

Composición (base húmeda)	Media (%)
Proteína	10.73 ± 0.07
Humedad	85.57 ± 0.13
Ceniza	1.13 ± 0.04
Grasa	2.37 ± 0.34
pH	6.04 ± 0.01
Sólidos solubles (°Brix)	14.5 ± 0.10

± Intervalo de confianza de 95%.

CAPITULO IV:

IV. CONCLUSIONES

- El sustrato Anchoqueta peruana (*Engraulis ringens*) utilizado en este estudio tuvo una composición de $17.5 \pm 0.3\%$ de proteína cruda, $75.8 \pm 0.2\%$ de humedad, $3.4 \pm 0.02\%$ de ceniza y 4.6 ± 0.3 de grasa.
- La actividad enzimática proteasa (AEP) de Corolase 8000 y Corolase 7089 sobre la caseína fue de 827.5 ± 3.5 U/ml y 1049.6 ± 138.1 U/ml, respectivamente, a 60°C con pH 6.1.
- La temperatura y la concentración de Corolase 8000 tuvieron un efecto significativo sobre la hidrólisis de la anchoqueta, mientras que la concentración Corolase 7089 no mostró un efecto significativo sobre los indicadores de rendimiento de la misma, por lo que su aplicación es irrelevante.
- Las condiciones óptimas de temperatura y concentración de enzima para la hidrólisis de anchoqueta peruana entera fueron 50°C y 3.0% p/p de Corolase 8000.
- Los resultados de validación se ajustaron eficientemente al modelo matemático (IC 95%) y se alcanzaron valores máximos de Grado de Hidrólisis de $30.9 \pm 0.8\%$ y Recuperación de Proteínas de $84.3 \pm 3.6\%$ en 120 minutos de reacción en la hidrólisis enzimática de la Anchoqueta peruana entera.

CAPITULO V:

V. RECOMENDACIONES

- Evaluar la temperatura óptima de hidrólisis de la anchoveta peruana en un rango menor de 50°C. Asimismo, otros parámetros como pH y dilución de sustrato para optimizar la hidrólisis de anchoveta peruana con Corolase 8000.
- Estudiar el efecto de los parámetros de manera individual para cada enzima Corolase 8000 y Corolase 7089, y probar el funcionamiento de ambas enzimas en bioprocesos independientes.
- Evaluar el efecto de la temperatura y concentración de las enzimas de Corolase 8000 y Corolase 7089 inmovilizadas en sustratos poliméricos.
- Evaluar el efecto de las condiciones óptimas de hidrólisis sobre la distribución de péptidos y las potenciales propiedades funcionales y bioactivas del hidrolizado de anchoveta peruana.
- Realizar la caracterización bioquímica de los péptidos y aminoácidos presentes en el hidrolizado de proteínas de anchoveta.
- Evaluar las características organolépticas y microbiológicas del hidrolizado de anchoveta como un potencial aditivo de alimentos.

CAPITULO VI:

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuine, R., Rathnayake, A. U., y Byun, H.-G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1984) *Official Methods of Analysis*. 14th Edition, Arlington.
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1995). *Official Methods of Analysis. True protein digestibility of foods*. 14th Edition, Maryland, USA.
- Aspevik, T., Egede-Nissen, H., & Oterhals, Å. (2016). A Systematic Approach to Comparison of the Cost Efficiency of Endopeptidases to Hydrolyze Atlantic Salmon (*Salmo salar*) By-Products. *Food Technology and Biotechnology*, 54(3). <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4553>
- Auwal, S., Zarei, M., Abdul-Hamid, A., y Saari, N. (2017). Response Surface Optimisation for the Production of Antioxidant Hydrolysates from Stone Fish Protein Using Bromelain. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017(10), 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/4765463>.
- Awuor, O. L., Edward Kirwa, M., Betty, M., & Jackim, M. F. (2017). Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Dagaa (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties. *Industrial Chemistry*, 03(01). <https://doi.org/10.4172/2469-9764.1000122>
- Baez-Suarez, A., Ospina-de-Barreneche, N., y Zapata-Montoya, J. (2016). Efecto de Temperatura, pH, Concentración de Sustrato y Tipo de Enzima en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*). *Información tecnológica*, 27(6), 63-76. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600007>

- Banco Wiese Sudameris. (2002). *Harina y aceite de pescado: Perspectivas fundamentales positivas* [Reporte sectorial]. Grupo IntesaBci. http://scotiabankfiles.azureedge.net/scotiabank-peru/PDFs/reportes/sectorial/20020925_sec_es_pesca.pdf
- Barrett, A. (1994). *Methods Enzymology. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases* Vol. 244. ISBN-13: 978-0121821456
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y Aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236. <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/49268/013080.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015>
- Boré, R., Henríquez, N., y Espinoza, G. (1989). *Chile: Sus recursos pesqueros*. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP). Chile.
- Bouchon, M. (2018). *La pesquería de anchoveta en Perú* [Tesis de doctorado, Universidad de Alicante]. RENATI. https://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/750837/1/Bouchon_Corrales_Marilu.pdf
- Bouchon, M., Ayón, P., Mori, J., Peña, C., Espinoza, P., Hutchings, L., Buitron B., Perea, A., Goicochea, C. y Messié, M. (2010). Biología de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens* Jenyns). *Boletín Instituto Del Mar Del Perú*, 25 (2): 30-35. <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/bitstream/123456789/1099/1/BOL%2025%281-2%29-3.pdf>.

- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1–45. <http://www.jstor.org/stable/2983966>
- Box, G. E. P., y Behnken, D. W. (1960). Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 2(4), 455–475. <https://doi.org/10.2307/1266454>
- Braimah, M., Anozie, A. y Odejobi, O. (2016). Utilization of Response Surface Methodology (RSM) in the Optimization of Crude oil Refinery Process, New Port-Harcourt Refinery, Nigeria. *Journal of Multidisciplinary Engineering, Science and Technology*, 3(1), 4361-4369.
- Buitrón, B. y Perea, A. (2000). Aspectos Reproductivos de la Anchoqueta Peruana durante el periodo 1992-2000. *Boletín Instituto Del Mar Del Perú*, 19(12), 45–53. <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/163>
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Introducing enzyme selectivity: A quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(24), 5827-5841. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8006-2>
- Chalamaiah, M., Dinesh, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(1), 3020–3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100
- Civera, R., Goytortúa, S., Rocha, H., Nolasco, F., Vega, E., Balart, E., Amador, G., Ponce, G., Colado, J., Lucero, C., Rodríguez, J., Solano, A., Flores, T., Monroy, J. y Coral, G. (2019). Uso de la Langostilla Roja *Pleuroncodes planipes* en la Nutrición de Organismos Acuáticos. *Avances En Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/307>
- Cornell, J.A. (1990). *How to Apply Response Surface Methodology*. (3ª ed., Vol. 8). Editorial American Society for Quality Control.

- Costa, M., Costas, B., Machado, M., Teixeira, C., Fernández-Boo, S., Sá, T., Batista, S., Marques, A., Miranda, F., y Valente, L. M. P. (2020). Anchovy and giant squid hydrolysates can enhance growth and the immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant-protein-based diets. *Aquaculture*, 523, 735182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735182>
- Cubillos, L., Serra, R. y Fréon, P. (2007). Synchronous pattern of fluctuation in three anchovy fisheries in the Humboldt Current System. *Aquatic Living Resources*, 20(1), 69–75. <https://doi.org/10.1051/alr:2007017>
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay—Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 19, 899. <https://doi.org/10.3791/899>
- De La Puente, O., Sueiro, J., Heck, C., Soldi, G., De La Puente, S. (2011). *La pesquería peruana de anchoveta*. Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima). Centro para la Sostenibilidad Ambiental. ISBN: 978-9972-9024-9-9
- Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., y Marshall, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124, 640–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.088>
- Dhillon, A., Sharma, K., Rajulapati, V., & Goyal, A. (2017). Proteolytic Enzymes. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 149-173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00007-5>
- Elias, R., Kellerby, S., y Decker, E. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701425615>. PMID:18464032.
- Fonseca-Rodríguez, C., & Chavarría-Solera, F. (2017). Composición proximal en algunas especies de pescado y mariscos disponibles en el pacífico costarricense. *Uniciencia*, 31(1), 23. <https://doi.org/10.15359/ru.31-1.3>

- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- Guerard, F., y Dufosse, L. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051-1059.
- Guo, X., Han, X., He, Y., Du, H., & Tan, Z. (2014). Optimization of Enzymatic Hydrolysis for Preparation of Shrimp Flavor Precursor Using Response Surface Methodology: Enzymatic Hydrolysis for Shrimp Flavor Precursor. *Journal of Food Quality*, 37(4), 229-236. <https://doi.org/10.1111/jfq.12091>
- Guo, Y., Michael, N., Madrigal, J. F., Aguirre, C. S., & Jauregi, P. (2019). Protein Hydrolysate from *Pterygoplichthys disjunctivus*, Armoured Catfish, with High Antioxidant Activity. *Molecules*, 24;25(8), 16-28. <https://doi.org/10.3390/molecules24081628>.
- Gutiérrez Pulido, H., y Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill.
- Halim, N., Yusof, H., y Sarbon, N. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science y Technology*, 51(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>
- Hall, G. y Ahmad, N. (1997). *Surimi and Fish Mince Products*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1113-3_3
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(1),163–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- He, S., Wang, F., Ning, Z., Yang, B., & Wang, Y. (2014). Preparation of anchovy (*Engraulis japonicus*) protein hydrolysates with high free radical-scavenging activity using endogenous and commercial enzymes. *Food Science and Technology International*, 20(8), 567-578. <https://doi.org/10.1177/1082013213496418>

- Hernández, E. (2007). *Estudio comparativo de diseños experimentales de superficie de respuesta para la optimización de factores limitantes en procesos industriales* [Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey]. <https://repositorio.tec.mx/handle/11285/568535>
- Herpandi, H., Huda, N., Rosma, A., & Wa Wan, N. (2012). Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. *International Food Research Journal*, 9(3), 863-867.
- Hien, B. T. T., Diem, P. T., Tung, L. A., Huong, T. T., Hoang, N. H., Bat, N. K., & Nghia, N. V. (2022). Optimizing enzymatic hydrolysis for feed production from catfish by-products. *Foods and Raw Materials*, 10(1), 8.
- Hou, H., & Li, B. (2011). Response Surface Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Silver Sillago (*Sillago sihama*) with Low Bitter Taste. *International Journal of Food Engineering*, 7(3). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.2007>
- Instituto del Mar del Perú [IMARPE] e Instituto Tecnológico Pesquero del Perú [ITP]. (1996). *Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú*. Instituto del Mar del Perú.
- Instituto del Mar del Perú [IMARPE]. (2015). *Recursos pesquería: Anchoveta*. http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos_pesquerias/
- Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual [INDECOPI]. (2010). *Determinación de humedad. Norma técnica peruana NTP 204.030:1985*.
- Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual [INDECOPI]. (2010). *Análisis de grasa total. Norma técnica peruana NTP 204.033:1985*
- Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI]. (2021). *Evolución de las Exportaciones e Importaciones* [Informe Técnico].

<https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/03-informe-tecnico-evol-de-expor-e-impor-ene-2021.pdf>

International Fishmeal and Fish Oil Organization [IFFO]. (2007). *La Producción de harina y aceite de pescado de la Anchoveta Peruana*.
<https://oneproseso.webcindario.com/La%20Produccion%20de%20harina%20de%20pescado%20en%20el%20Peru.pdf>

Joung, J. A., Park, M. N., You, J. Y., Song, B. J., & Choi, J. H. (2018). Application of Food-Grade Proteolytic Enzyme for the Hydrolysis of Regenerated Silk Fibroin from *Bombyx mori*. *Journal of Chemistry*, 2018, 1-9.
<https://doi.org/10.1155/2018/1285823>

Kanu, P. J., Kanu, J. B., H. Sandy, E., B.A. Kande, J., Mornya, P. M. P., & Huiming, Z. (2009). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Defatted Sesame Flour by Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of the Resulting Protein Hydrolysate. *American Journal of Food Technology*, 4(6), 226-240.
<https://doi.org/10.3923/ajft.2009.226.240>

Kleeberg, F., y Nieto, M. (2001). *La industria pesquera en el Perú*. Universidad de Lima, Fondo Editorial

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657-666.
<https://doi.org/10.1021/jf990447v>

Kurniawan, K., Lestari, S., Hanggita, S. (2012). Hidrolisis Protein Tinta Cumi-cumi (Loligo sp) Dengan Enzim Papain. *Jurnal Fishtech*, 1(1), 40-54.

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155-1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>

- Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Mac Leod, M. y Pezo, S. (2004). Elaboración de un Plan de Higiene para la Planta de Procesamiento de Recursos Hidrobiológicos Aquapisco S.A., un Plan HACCP y un Plan de Calidad para la Línea de Anchoqueta Fresca Refrigerada. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina].
- Majeed, M., Hussain, A., Chatha, S., Khosa, M., Mustafa, G., Kamal, M., Zhang, X., Liu, M. (2016). Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 389-96. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.010>
- Mamaug, R. y Ragaza, J. (2016). Growth and feed performance, digestibility and acute stress response of juvenile grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) fed diets with hydrolysate from milkfish offal. *Aquaculture Research*, 48(4), 1638-1647. <https://doi.org/10.1111/are.12999>
- Mantilla, M. (2013). *Elaboración de paté embutido a base de carne de anchoqueta (Engraulis Ringens) con grasas vegetales*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/2869>
- Ministerio de la Producción [PRODUCE]. (2021). *Desarrollo Productivo de la Actividad Pesquera* [Boletín del Sector Pesquero]. <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oe-documentos-publicaciones/boletines-pesca/item/990-2021-mayo-boletin-del-sector-pesquero>
- Mohan, C. (2006). Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. *EMD Bioscience*.
- Nassiri, M. (2020). Advances in modeling saffron growth and development at different scales. *Saffron*, 139–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00009-5>

- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology*, 66(5), 642-646.
- Noman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>
- Opheim, M. (2015). *Hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) rest raw materials: Influence of process conditions and evaluation of hydrolysate in diets for broiler chickens and piglets* [Tesis Doctoral]. Norwegian University of Life Sciences.
- Ordoñez, L. R., & Hernández, E. M. (2014). Efecto del proceso de elaboración de la conserva «desmenuzado de anchoveta» (*Engraulis ringens*) sobre los ácidos grasos poliinsaturados Omega 3. *Ciencia e Investigación*, 17(1), 27-32.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (1975). *La producción de harina y aceite de pescado*. Roma. Italia
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020*. <http://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2021). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2021*. <https://doi.org/10.4060/cb4474es>
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>
- Ovissipour, M., Kenari, A. A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., & Nazari, R. M. (2011). Optimization of Protein Recovery During Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus*

albacares) Visceral Proteins. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20(2), 148-159. <https://doi.org/10.1080/10498850.2010.548910>

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. (2012). Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Visceral Protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 460-465. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0284-x>

Pandia, S., Solari, A., Albrecht-Ruiz, M., & Salas, A. (2013). Hidrólisis Enzimática de Residuos de Anchoqueta y Anchoqueta Entera a Nivel Piloto y Caracterización de sus Productos. *Bolétin de Investigación del Instituto Tecnológico de Producción*, 11, 21-28.

Park, H. J., Han, S. J., Yim, J. H., & Kim, D. (2018). Characterization of an Antarctic alkaline protease, a cold-active enzyme for laundry detergents. *The Korean Journal of Microbiology*, 54(1), 60-68. <https://doi.org/10.7845/KJM.2018.7080>

Pazinatto, C., Malta, L., Pastore, G., & Maria F., N. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33(3), 485-493. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000076>.

Petrova, I., Tolstorebrov, I., y Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: Technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*, 10(3), 223-241. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>

Rahman, M. S., Islam, M. R., Mondol, O. K., Rahman, M. S., Sabrin, F., & Zohora, U. S. (2018). Screening of protease producing bacteria from tannery wastes of leather processing industries at Hazaribag, Bangladesh. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 7(1), 23-34. <https://doi.org/10.3329/jujbs.v7i1.37970>

Ramakrishnan, VV., Ghaly, AE., Brooks, MS., & Budge, SM. (2013). Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000130>

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Roldán, D., Omote-Sibina, Jr., & Molleda, A. (2021). Elaboración de un hidrolizado de proteína de anchoveta (*Engraulis Ringens*) en polvo. *Anales Científicos*, 82(2), 251-261. <https://doi.org/10.21704/ac.v82i2.1787>
- Roslan, J., Kamal, M., & Yunus, K. (2014). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Muscle (*Oreochromis niloticus*) using Response Surface Methodology (RSM). *Sains Malaysiana*, 43(11), 1715-1723.
- Sabotič, J., Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(4), 1351-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>
- Salwanee, S., Wan Aida, W. M., Mamot, S., MAskat, M. Y., y Ibrahim, S. (2013). Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. *Sains Malaysiana*, 43(3), 279-287.
- Sánchez, C. (2019). Influencia de la adición de concentrado de agua de cola en el incremento de la acidez (en ácido oleico) en harina de pescado integral. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión]. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/3743>
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G. de, Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2), 375-381. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.000216>

- See, S. F., Hoo, L. L., & Babji, A. S. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal*, 18(4), 1359-1365.
- Shahidi, F. y Ambigaipalan, P. (2015). Novel functional food ingredients from marine sources. *Current Opinion in Food Science*, 2(1),123-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.009>
- Shankar, T. J., Sokhansanj, S., Bandyopadhyay, S., & Bawa, A. (2010). A Case Study on Optimization of Biomass Flow During Single-Screw Extrusion Cooking Using Genetic Algorithm (GA) and Response Surface Method (RSM). *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 498–510. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0172-9>
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69-78. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0032>
- Siddik, M. A. B., Howieson, J., Fotedar, R., y Partridge, G. J. (2021). Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 406-430. <https://doi.org/10.1111/raq.12481>
- Sifuentes-Penagos, G., León-Vásquez, S., & Castillo, A. (2018). Hydrolysis of proteins from anchovy (*Engraulis ringens*) whole by action of the Protamex™ enzyme. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 93-102. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.10>
- Silva, V., Eusébio, D., & Cardoso, J. (2018). Introductory Chapter: How to Use Design of Experiments Methodology to Get Most from Chemical Processes. In V. Silva, (Ed.), *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74061>
- Silvestre, M. P. C., Morais, H. A., Silva, V. D. M., & Silva, M. R. (2013). Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire*, 38(3), 278-290. <https://doi.org/10.4322/nutrire.2013.026>

- Sowmya, R., Ravikumar, T. M., Vivek, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. M. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3199-3207. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0815-8>
- Sumantha, A. y Pandey, A. (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 211–220. ISSN: 1330-9862
- Tak, B., Tak, B., Kim, Y., Park, Y., Yoon, Y., & Min, G. (2015). Optimization of color and COD removal from livestock wastewater by electrocoagulation process: Application of Box–Behnken design (BBD). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28(1), 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.03.008>
- Theron, L., y Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 8853–8868. DOI: 10.1007/s00253-014-6035-6
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., De la Barra, F. (2012). El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2), 201–209. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000200009>
- Veloortalappil, J., Robinson, S., Selvanesan, P., Sreedevi, S., Kizhakkepawothail, U., Sreedharan, S., Prakasan, P., Moolakkariyil, S. J., & Sailas, B. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 01(03), 39-51. <https://doi.org/10.4236/aer.2013.13005>
- Venugopal, V. (2016). Enzymes from Seafood Processing Waste and Their Applications in Seafood Processing. *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 78. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.004>

- Wang, B., Li, L., Chi, C., Ma, J., Luo, H. y Xu, Y. (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1713-9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.002
- Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., y Chamcheun, C. (2015). Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(6), 466-470.
- Yin, S., Tang, C., Cao, J., Hu, E., Wen, Q., Yang, X. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 106 (3), 1004-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.030>
- Yin, X., Wu, P., Li, Y. y Yan, X. (2012). Mercury Speciation and Binding to Biomacromolecules. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 435–460. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00094-6>
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., y Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: An Overview. *Marine Biotechnology*, 20(2), doi:118-130. 10.1007/s10126-018-9799-3.
- Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis Enzimática de la Proteína de Vísceras de Trucha Arco Íris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de Enzima, Temperatura, pH y Velocidad de Agitación. *Información tecnológica*, 30(6), 63-72. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000600063>

CAPITULO VII

VII. ANEXOS

ANEXO 1

FICHAS TÉCNICAS DE PROTEASAS COMERCIALES COROLASE 7089 Y COROLASE 8000

 <p>COROLASE® 7089 Neutral protease enzyme for protein hydrolysis applications, brewing and distilling</p> <p>PRODUCT DESCRIPTION COROLASE® 7089 is a liquid formulated bacterial endopeptidase (metallo- & serine protease) enzyme preparation for hydrolysing high molecular protein into low molecular peptides. This product is characterized by its ability to hydrolyse a broad range of substrates ideally at neutral pH. Typical protein substrates include casein, whey, meat, fish, soy, gelatin and some grain types. COROLASE® 7089 is also recommended for hydrolysing protein in distilling and brewing. COROLASE® 7089 is produced by controlled fermentation of a classical strain of <i>Bacillus subtilis</i>.</p> <p>PRODUCT CHARACTERISTICS COROLASE® 7089 has the following characteristics & specifications:</p> <ul style="list-style-type: none">• Liquid formulation.• Composition: protease concentrate (40%), specific protein: 1.5%, glycerol (30%), sorbitol (30%).• Light brown colour with characteristic aromatic odour.• Density: ~1.15 g/ml• Activity: Minimum 840 UHb/g. A method of analysis is available on request.• IUB: 3.4.2x.xx• CAS: 9001-92-7 <p>COROLASE® 7089 complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.</p> <p>APPLICATION COROLASE® 7089 is characterized by its ability to hydrolyse a broad range of substrates preferably around neutral pH. It is ideally suited for (food grade) protein hydrolysis applications in which pH adjustment is either not feasible or not necessary. COROLASE® 7089 may be used either as a single enzyme or in combination with other proteinases or other enzyme activities.</p> <p>Protein hydrolysis applications: COROLASE® 7089 is used for the hydrolysis of proteins from several sources. Typical applications include the production of hydrolysates of wheat gluten, soya protein, gelatine, upgrade of fish protein from by-products and milk proteins. COROLASE® 7089 is used either as a single enzyme or in combination with other proteinases.</p> <p>Brewing: In the brewery COROLASE® 7089 is used to supply the missing protease activity when processing barley or low-quality malt. COROLASE® 7089 is not inhibited by barleyprotease-inhibitors and therefore high values of α-amino-nitrogen are achieved. The addition is carried out during the mashing.</p> <p>Distilling: Depending on the type of cereals used for alcohol production and depending on the quality of the grain, the enzymatic hydrolysis of starch may partially be blocked by the existence of a protein-starch-matrix. This may lead to poor alcohol yields. The use of COROLASE® 7089 improves the separation of protein from starch and increases the alcohol yield. COROLASE® 7089 forms low molecular peptides, which do not sediment at the wall of the mash tun, the fermenters or the distilling equipment and therefore incrustations in these equipments are reduced or avoided.</p> <p style="text-align: right;">COROLASE® 7089, Page 1 of 2</p> 	 <p>COROLASE® 7089 Neutral protease enzyme for protein hydrolysis applications, brewing and distilling</p> <p>DOSAGE The dosage of the enzyme depends on raw materials used, reaction conditions such as pH, temperature and time, and the desired degree of hydrolysis. The optimal dose rate should be determined in trials.</p> <p>pH range: 5.5-9.0 Temperature range: up to 60 °C</p> <p>For initial trials, typical dosages are: Protein hydrolysis: 0.01-0.5 % based on protein content Brewing: 50-250 g/ton (ppm) raw material Distilling: 50-100 g/ton (ppm) raw material</p> <p>PACKAGING COROLASE® 7089 is available in 25 kg PE canisters, and 1000 kg IBCs.</p> <p>STORAGE & HANDLING When stored in the original, unopened packaging at dry conditions and at temperatures <10 °C, COROLASE® 7089 is best used within 24 months from the date of production. Avoid unnecessary contact with enzyme preparations during handling and avoid the formation of aerosols. Repeated inhalation of enzyme aerosol may cause sensitisation and possibly allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information and instructions, please refer to the Safety Data Sheet (SDS).</p> <p>DISCLAIMER AB Enzymes GmbH. COROLASE® is a registered trademark of AB Enzymes GmbH. Use and/or sale of these products may be covered by one or more patents as well as patent applications in EU, US and other countries. Product registration requirements apply in selected regions and countries; consult with AB Enzymes for latest updates on product registrations and product availability in your country. We have used diligent efforts to ensure that all information and statements given in this brochure are correct at the time of publication. Despite thereof, neither AB Enzymes GmbH nor RÖAL OY nor any of their affiliates can guarantee, represent or warrant that the information and statements are accurate, current and/or complete. As the user controls the application or specific use of our products as well as the technical conditions thereof, we cannot make any representations or warranties with respect to this specific use or application including, but not limited to, any results obtained in the processing of our products. The customer or user is solely responsible for its specific use or application of our products and that such use or application will comply with applicable laws, regulations and all patent or other intellectual property rights of third parties. All information and statements are intended for persons having the required skill and know-how and do not relieve the customer or user from verifying the suitability of information and statements given for a specific purpose prior to use of products. We reserve the right to change content of this brochure, product specifications and not specified properties of the products without prior notice.</p> <p>AB Enzymes GmbH Feldbergstrasse 78 64293 Darmstadt Germany Tel: +49 (0)6151 3680 100 Email: info@abenzymes.com www.abenzymes.com</p> <p style="text-align: right;">2017-07-27, RevNo. 05</p> <p style="text-align: right;">COROLASE® 7089, Page 2 of 2</p> 
---	--

Figura 13. Ficha técnica de enzima Corolase 7089. Fuente: AB Enzymes, 2017.



COROLASE® 8000

Alkaline protease enzyme for protein hydrolysis applications

PRODUCT DESCRIPTION

COROLASE® 8000 is a thermotolerant food grade fungal alkaline protease enzyme preparation ideal for hydrolysing proteins under mildly alkaline conditions. Specifically, it is a serine endo-protease (thermomycolin) and can also be described as an endopeptidase.

COROLASE® 8000 is produced by controlled fermentation of a genetically modified strain of *Trichoderma reesei*.

PRODUCT CHARACTERISTICS

COROLASE® 8000 has the following characteristics & specifications:

- Liquid formulation.
- Light brown colour with characteristic odour.
- Density: ~1.10 g/ml.
- Activity: Minimum 100.000 BPU/g. A method of analysis is available on request.
- IUB: 3.4.21.65
- CAS: 52233-31-5

COROLASE® 8000 complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.

APPLICATIONS

COROLASE® 8000 can be used for many sorts of protein hydrolysis whether from vegetal or animal origin. It can be used to achieve a high degree of hydrolysis.

COROLASE® 8000 is able to hydrolyse a broad range of proteins at and above neutral pH. It may be used either on its own or in combination with other proteases or other enzyme activities.

Typical applications include the hydrolysis of wheat gluten, soya protein, gelatine, milk proteins, recycling of meat off-cuts and recovery of fish protein from by-products.

The product can be used over a wide pH and temperature range:

- pH: 6.0 - 10.0
- Temperature: up to 80 °C

DOSAGE

The dosage of the enzyme depends on raw materials used, reaction conditions such as pH, temperature and time, and the desired degree of hydrolysis. The optimal dose rate should be determined in trials.

For initial trials, typical dosages are: 0.1 - 2.0% based on the protein content.

COROLASE® 8000, Page 1 of 3



COROLASE® 8000

Alkaline protease enzyme for protein hydrolysis applications

PACKAGING

COROLASE® 8000 is available in 25 kg PE canisters and 1000 kg IBCs.

STORAGE & HANDLING

When stored in the original, unopened packaging at dry conditions and at temperatures below 10°C, COROLASE® 8000 is best used within 12 months from the date of production. Avoid unnecessary contact with enzyme preparations during handling and avoid the formation of aerosols. Repeated inhalation of enzyme aerosol may cause sensitisation and possibly allergic type reactions in sensitised individuals. For detailed information and instructions, please refer to the Safety Data Sheet (SDS).

DISCLAIMER

©AB Enzymes GmbH. COROLASE® is a registered trademark of AB Enzymes GmbH. Use and/or sale of these products may be covered by one or more patents as well as patent applications in EU, US and other countries. Product registration requirements apply in selected regions and countries; consult with AB Enzymes for latest updates on product registrations and product availability in your country. We have used diligent efforts to ensure that all information and statements given in this brochure are correct at the time of publication. Despite thereof, neither AB Enzymes GmbH nor ROAL OY nor any of their affiliates can guarantee, represent or warrant that the information and statements are accurate, current and/or complete. As the user controls the application or specific use of our products as well as the technical conditions thereof, we cannot make any representations or warranties with respect to this specific use or application including, but not limited to, any results obtained in the processing of our products. The customer or user is solely responsible for its specific use or application of our products and that such use or application will comply with applicable laws, regulations and all patent or other intellectual property rights of third parties. All information and statements are intended for persons having the required skill and know-how and do not relieve the customer or user from verifying the suitability of information and statements given for a specific purpose prior to use of products. We reserve the right to change content of this brochure, product specifications and not specified properties of the products without prior notice.

AB Enzymes GmbH
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt

2017-07-28, RevNo. 00

COROLASE® 8000, Page 2 of 3



Figura 14. Ficha técnica de enzima Corolase 8000. Fuente: ABEnzymes, 2017.

ANEXO 2

CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA USANDO CASEÍNA COMO SUSTRATO (CUPP-ENYARD, 2008).

1. Reactivos

- Caseína de leche bovina.
- L-Tirosina base libre.
- Ácido tricloroacético (TCA).
- Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3).
- Fosfato dipotásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
- Reactivo Fenol Folin's (Folin y Ciocaltea's) 0.5mM.
- Acetato de Sodio $3\text{H}_2\text{O}$.
- Acetato de Calcio hidrato.
- HCl 1 M.
- NaOH 1 M.

2. Procedimiento

- a) Añadir 5 ml de solución de caseína 0.65% p/v en 4 tubos de ensayo e incubar a 37°C durante 5 minutos.
- b) Añadir el volumen de enzima. Agitar e incubar durante 10 minutos a 37°C .
- c) Añadir 5 ml de TCA a cada tubo para la inactivación de la reacción enzimática.
- d) Añadir un volumen de solución de enzima para completar 1 ml e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Tabla 23. Procedimiento del ensayo de cuantificación de actividad enzimática proteasa.

Reactivo	1	2	3	Blanco
Caseína (0.65% p/v) (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
Solución de enzima (ml)	0.5	0.7	1.0	---
Ácido tricloroacético (TCA) (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
Solución de enzima (ml)	0.5	0.3	---	1.0

- e) Filtrar los ensayos a través de filtros de jeringa (0.45 μm) y traspasar 2 ml de filtrado a nuevos tubos.
- f) Añadir 5 ml de carbonato de sodio 500 mM y 1 ml de reactivo de Folin y Ciocaltea's 0.5 mM. Agitar e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- g) Filtrar los ensayos a través de filtros de jeringa (0.45 μm)
- h) Realizar la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a longitud de onda de 660 nm.

2.1. Preparación de la curva de calibrado

- a. Disponer de 6 tubos de ensayo. Añadir volúmenes del estándar de tirosina 1.1 mM en un rango de 0.05-0.5 ml y completar con agua destilada hasta 2 ml según la Tabla 13.
- b. Tras realizar la serie de diluciones estándar de tirosina, seguir los pasos f, g y h del apartado anterior.
- c. Determinar la absorbancia total mediante la diferencia entre la absorbancia medida de los estándares y el blanco según la ecuación:

$$A_{660\text{nm}(std)TOTAL} = A_{660\text{nm}(std)} - A_{660\text{nm}(Blanco)}$$

- d. Graficar una curva de calibración de $Abs_{600\text{nm}}$ (eje y) vs. concentración de tirosina (eje x), considerando las concentraciones de tirosina en cada dilución de los estándares

Tabla 24. Preparación de la curva de calibración de tirosina.

Tubo	Estándar		Concentración amino-eq (uM)
	Tirosina (ml)	Agua (ml)	
Blanco	0	2	0.000
1	0.05	1.95	0.055
2	0.1	1.9	0.111
3	0.2	1.8	0.221
4	0.4	1.6	0.442
5	0.5	1.5	0.553

2.2. Cálculo de la actividad enzimática

- Determinar la concentración de tirosina en cada ensayo en relación a su absorbancia en la curva de calibración.
- Se cuantifica la actividad enzimática, definiendo una unidad (U) como la cantidad de Tirosina-equivalentes (μmol) liberados de la caseína por minuto en las condiciones del ensayo. El cálculo se realiza mediante la fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{A \times B}{C \times D \times E}$$

Donde:

A= Concentración de tirosina en la muestra (μM).

B= Volumen total del ensayo (ml).

C= Tiempo de reacción enzimática (min).

D= Volumen de proteasa utilizada (ml).

E= Volumen de muestra para análisis espectrofotómetro (ml).

3. Resultados

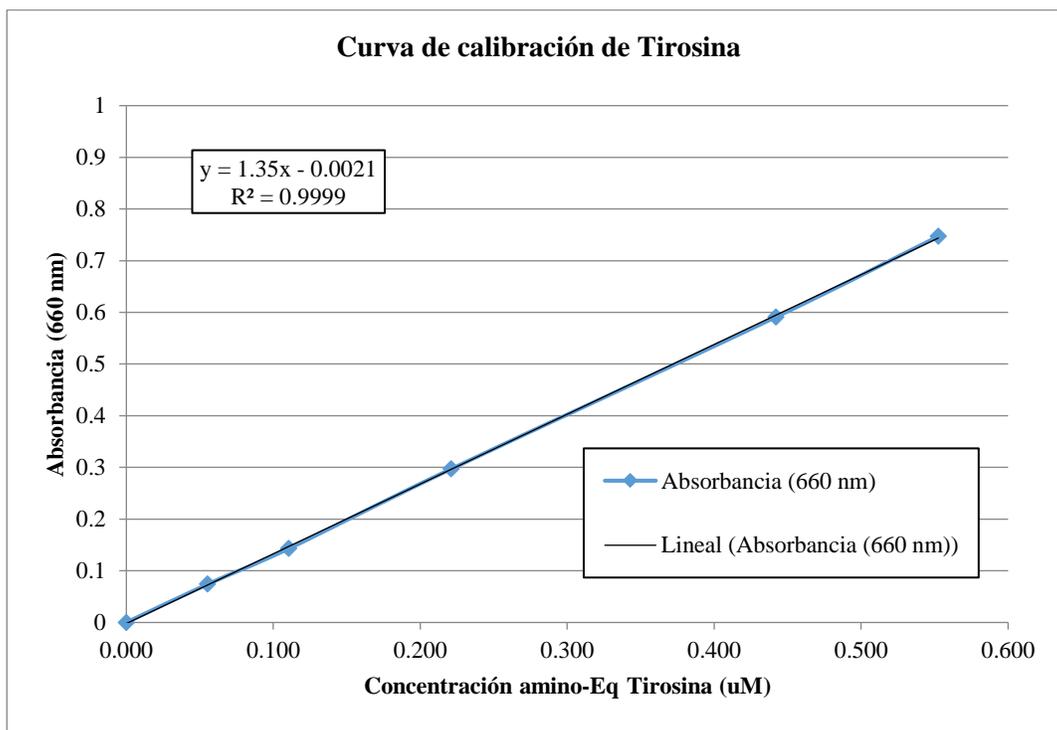


Figura 15. Curva de calibración de Tirosina. Fuente: elaboración propia.

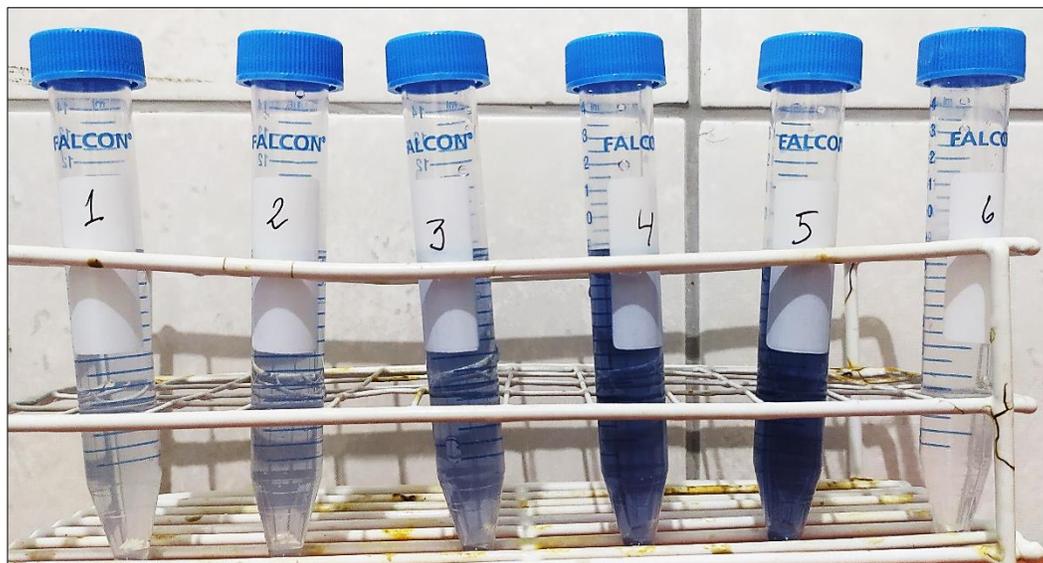


Figura 16. Preparación de la curva de calibración. Tubos de ensayo con diferentes concentraciones de tirosina muestran una escala de intensidad de la coloración al reaccionar con el reactivo Folin & Ciocaltea's

Tabla 25. Cálculo de actividad enzimática de Corolase 8000 a 60°C.

Tubo (N°)	Ensayo 1					Ensayo 2				
	Abs (660 nm)	amino- eq (uM)	Enzima (ml)	Actividad Enzimática (U/ml)	Actividad Enzimática (U/ml) total	Abs (660 nm)	amino- eq (uM)	Enzima (ml)	Actividad Enzimática (U/ml)	Actividad Enzimática (U/ml) total
1	0.264	0.197	0.5	0.217	0.209	0.249	0.186	0.5	0.205	0.191
2	0.371	0.276	0.7	0.217		0.314	0.234	0.7	0.184	
3	0.475	0.353	1	0.194		0.447	0.333	1	0.183	

Ensayo (N°)	Act. Enz. (U/ml)	Enzima (g)*	Densidad (g/ml)	Enzima (ml)	Dilución (v/v)	Act. Enz. (U/ml)	Promedio	Desv. Est.	Int Conf (95%)
1	0.209	0.0279	1.1	0.0254	3943	825.78	827.54	2.5	3.5
2	0.191	0.02527	1.1	0.0230	4353	829.30			

* enzima (g) diluida para el ensayo.

Nota: se realizó el mismo procedimiento de cálculo para Corolase 8000 y Corolase 7089 a 50, 60 y 70°C.

ANEXO 3

MÉTODO ORTOFTALDEHÍDO (OPA) PARA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS (NIELSEN *ET AL.*, 2001; GUO *ET AL.*, 2019).

1. Preparación de reactivos

- b) 7.62 g di-tetraborato sódico 10H₂O y 200 mg SDS en 150 ml de agua destilada.
- c) 160 mg o-ftalaldehído OPA 99% en 4 ml etanol y adicionar a la solución anterior.
- d) Añadir a la mezcla 176 mg DTT 99% y aforar hasta 200 ml.
- e) **Estándar de serina:** Disolver 50 mg en 500 ml de agua destilada para una solución 0.9516 meqv/L.

4. Análisis de muestras de hidrolizado

- a) Realizar una dilución de la muestra de hidrolizado (fase soluble) en 1:500 v/v.
- b) Tomar 400 uL de muestra diluida.
- c) Añadir 3 ml de reactivo OPA
- d) Agitar en vortex por 5 segundos y reposar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- e) Realizar la lectura en espectrofotómetro UV/VIS con longitud de onda de 340 nm.

5. Cálculo del grado de hidrólisis

Calcular el grado de hidrólisis mediante las siguientes fórmulas:

$$GH(\%) = \frac{h}{htotal}$$

Donde:

h : Número de enlaces rotos (meqv/g).

$htotal$: Número de enlaces peptídicos (meqv/g). 8.6 para pescado.

$$h = \frac{serina\ NH2 - \beta}{\alpha}$$

Donde:

α : 1.0. Constante para proteína de pescado.

β : 0.4. Constante para concentrado de pescado.

$$\text{Serina NH}_2 = \left(\frac{DO_m - DO_b}{DO_{est} - DO_b} \right) * 0.9516 * \left(\frac{D}{P} \right)$$

Donde:

SerinaNH₂ : meqv serinaNH₂/g proteína.

DO_m : Absorbancia de la muestra (nm).

DO_{est} : Absorbancia del estándar serina (nm).

DO_b : Absorbancia del blanco (nm).

0.9516 : meqv serina/L.

D : Factor de dilución de la muestra.

P : Concentración de proteína en muestra (g/L).

6. Resultados



Figura 17. Determinación de grado de hidrólisis por el método OPA. Preparación de las muestras y Lectura de absorbancia en espectrofotómetro para el análisis de los hidrolizados enzimáticos de anchoveta.

Tabla 26. Cálculo de Grado de Hidrólisis de hidrolizados de anchoveta por método OPA.

Código muestra	Proteína en muestra (%)	Proteína en ensayo (g/L)	Abs (340 nm) Blanco	Abs (340 nm) muestra	Abs. Total	Serina NH₂ (meqv/g)	Factor h (meqv/g)	Grado hidrólisis (%)
E1	5.48	54.84	0.13	0.199	0.069	0.92	0.52	6.0
E2	8.54	85.36	0.118	0.39	0.272	2.33	1.93	22.4
E3	6.71	67.08	0.123	0.298	0.175	1.91	1.51	17.5
E4	8.18	81.82	0.124	0.353	0.229	2.05	1.65	19.1
E5	7.12	71.19	0.183	0.374	0.191	1.96	1.56	18.2
E6	8.86	88.58	0.129	0.433	0.304	2.51	2.11	24.5
E7	4.88	48.80	0.096	0.154	0.058	0.87	0.47	5.4
E8	7.47	74.67	0.099	0.308	0.209	2.05	1.65	19.1
E9	8.43	84.34	0.13	0.464	0.334	2.89	2.49	29.0
E10	8.58	85.85	0.13	0.484	0.354	3.01	2.61	30.4
E11	7.07	70.72	0.108	0.268	0.16	1.65	1.25	14.6
E12	6.82	68.16	0.072	0.248	0.176	1.89	1.49	17.3
E13	7.26	72.59	0.112	0.321	0.209	2.10	1.70	19.8
E14	8.15	81.54	0.114	0.354	0.24	2.15	1.75	20.4
E15	7.52	75.23	0.126	0.334	0.208	2.02	1.62	18.8
Opt 1	9.01	90.10	0.115	0.471	0.356	2.89	2.49	28.9
Opt 2	8.91	89.10	0.107	0.5	0.393	3.22	2.82	32.8

ANEXO 4

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ANCHOVETA (IMÁGENES)



Figura 18. Anchoqueta peruana (Engraulis ringens) utilizada en este estudio. Ejemplares adultos (longitud mayor de 12 cm).



Figura 19. Bioreactor (Marca Applikon, modelo Ez2-control) empleado en los experimentos de hidrólisis enzimática. Vaso del bioreactor conteniendo el hidrolizado líquido de anchoveta.

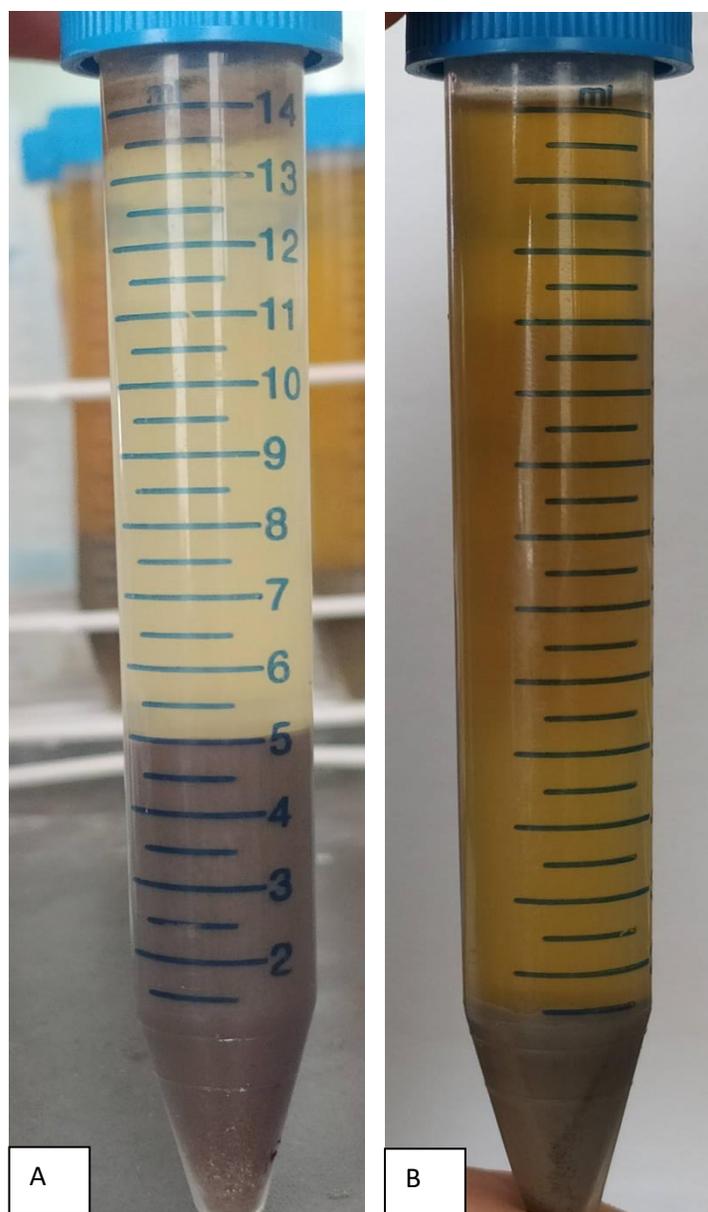


Figura 20. Hidrolizado líquido de anchoveta. Separación de fases mediante centrifugación: se muestra la fase oleosa (superior), soluble (centro) e insoluble (inferior). A) Estado inicial (antes de iniciar la hidrólisis); se observa un 30% de fase insoluble y una fase soluble poco clarificada. B) Estado final (120 minutos de hidrólisis): se observa un elevado porcentaje de solubilización, reduciéndose la fase insoluble a un 10% de la capacidad del tubo, con una fase soluble más oscura y fase oleosa casi nula.