

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“Evaluación de lipasas comerciales en la hidrólisis de aceite semi-refinado de anchoveta para la obtención de AGPI_n-3”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

AUTOR (ES):

Bach. Obeso Orbegozo, Andrea Lucinda Rosa

Bach. Zavaleta Pejerrey, Karol Cesia

ASESOR:

Dr. Castillo Calderón, Augusto

DNI N° 32931123

Código ORCID: 0000-0001-9237-8542

Nuevo Chimbote - Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



HOJA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR

El presente Informe final de Tesis ha sido revisado y desarrollado en cumplimiento del objetivo propuesto y reúne las condiciones formales y metodológicas, estando encuadrado dentro de las áreas y líneas de investigación conforme al reglamento general para obtener el Título Profesional en la Universidad Nacional del Santa de acuerdo con la denominación siguiente:

Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

“Evaluación de lipasas comerciales en la hidrólisis de aceite semi-refinado de anchoveta para la obtención de AGPI_n-3”

AUTOR (ES):

Bach. Obeso Orbegoza, Andrea Lucinda Rosa

Bach. Zavaleta Pejerrey, Karol Cesia

Dr. Castillo Calderón, Augusto

DNI N° 32931123

Código ORCID: 0000-0001-9237-8542

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



HOJA AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado **“Evaluación de lipasas comerciales en la hidrólisis de aceite semi-refinado de anchoveta para la obtención de AGPI_n-3”**, para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por los bachilleres, Obeso Orbegozo Andrea Lucinda Rosa y Zavaleta Pejerrey Karol Cesia, que tiene como asesor al Dr. Augusto Castillo Calderón designado por Resolución N° 524-2021-UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 12 de octubre del 2023, por el siguiente jurado evaluador designado mediante resolución N° 669-2023-UNS-CFI.



Ms. Elizalde Carranza Caballero
Presidente



Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario



Dr. César Moreno Rojo
Integrante

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 11:00 horas del día nueve de noviembre del dos mil veintitrés, se instalaron en el Auditorio de la EPIA, el Jurado Evaluador, designado mediante T/Resolución N° 669-2023-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Ms. Elizalde Carranza Caballero** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Dr. César Moreno Rojo** (Integrante)

Para dar inicio a la Sustentación del Informe Final de Tesis:

“EVALUACIÓN DE LIPASAS COMERCIALES EN LA HIDRÓLISIS DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA PARA LA OBTENCIÓN DE AGPI n-3”, elaborado por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **OBESO ORBEGOZO ANDREA LUCINDA ROSA**
- **ZAVALETA PEJERREY KAROL CESIA**

Asimismo, tiene como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**.

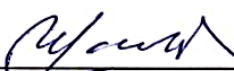
Finalizada la sustentación, el Tesisista respondió las preguntas formuladas por los miembros del Jurado Evaluador.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes en concordancia con el Artículo 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
OBESO ORBEGOZO ANDREA LUCINDA ROSA	20	EXCELENTE

Siendo las 12:30 horas del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el Jurado Evaluador.

Nuevo Chimbote, 09 de noviembre del 2023.


Ms. Elizalde Carranza Caballero
Presidente


Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario


Dr. César Moreno Rojo
Integrante

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 11:00 horas del día nueve de noviembre del dos mil veintitrés, se instalaron en el Auditorio de la EPIA, el Jurado Evaluador, designado mediante T/Resolución N° 669-2023-UNS-CFI integrado por los docentes:

- | | |
|--|---------------------|
| ➤ Ms. Elizalde Carranza Caballero | (Presidente) |
| ➤ Dr. Augusto Castillo Calderón | (Secretario) |
| ➤ Dr. César Moreno Rojo | (Integrante) |

Para dar inicio a la Sustentación del Informe Final de Tesis:

“EVALUACIÓN DE LIPASAS COMERCIALES EN LA HIDRÓLISIS DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA PARA LA OBTENCIÓN DE AGPI n-3”, elaborado por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **OBESO ORBEGOZO ANDREA LUCINDA ROSA**
- **ZAVALETA PEJERREY KAROL CESIA**

Asimismo, tiene como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**.

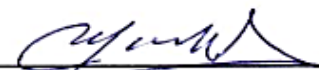
Finalizada la sustentación, el Tesista respondió las preguntas formuladas por los miembros del Jurado Evaluador.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes en concordancia con el Artículo 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
ZAVALETA PEJERREY KAROL CESIA	20	EXCELENTE

Siendo las 12:30 horas del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el Jurado Evaluador.

Nuevo Chimbote, 09 de noviembre del 2023.


Ms. Elizalde Carranza Caballero
Presidente


Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario


Dr. César Moreno Rojo
Integrante



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Karol Cesia ZAVALETA PEJERREY
Título del ejercicio:	TESIS
Título de la entrega:	INFORME DE TESIS KAROL Y ANDREA
Nombre del archivo:	TESIS-INFORME-FINAL-KAROL-Y-ANDREA-2023.docx
Tamaño del archivo:	16.72M
Total páginas:	126
Total de palabras:	18,011
Total de caracteres:	94,982
Fecha de entrega:	04-oct-2023 11:36a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre...	2185553703

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



"Evaluación de Espumas generadas en la hidrólisis de aceite vegetal
refinado de anchoeta para la obtención de AGP1a-3"

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

AUTORES:
Ing. ORIBIS ORRIGOSO, ANDREA LUCINDA RIVERA
Ing. ZAVALETA PEJERREY, KAROL CESIA

ASESOR:
Ing. CASTILLO ALBERON AUGUSTO

NEUQUEN, ARGENTINA - 2023

INFORME DE TESIS KAROL Y ANDREA

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	14%	2%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	8%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unicauca.edu.co:8080 Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1%
5	1library.co Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1%
7	qdoc.tips Fuente de Internet	<1%
8	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	

DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este informe de investigación a Dios, por brindarme la vida, la salud, por protegerme y guiarme día a día. A mis amados padres, Victor y Olga por su amor, sacrificio y esfuerzo, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional desde el inicio de esta carrera, son el motor y motivo en mi vida para seguir adelante. A mis queridos hermanos, Jarib y Uziel por ser piezas fundamentales en mi vida al acompañarme e impulsarme cada día a ser mejor, son el mejor regalo que Dios me pudo conceder. A mis familiares y amigos por estar a mi lado en los momentos difíciles y en las alegrías. A mi compañera Andrea por obsequiarme su gran amistad y apoyo en todo momento, brindándome su confianza para lograr culminar este proyecto que con mucho esfuerzo y esmero anhelamos obtener.

Karol Cesia Zavaleta Pejerrey

Dedico esta investigación a Dios por protegerme y encaminarme día a día, por fortalecerme y nunca dejarme decaer. A mis amados padres, Javier y Ana, por brindarme incondicionalmente su amor, cariño y apoyo en todo el proceso de superación en mi vida profesional, persistiendo y motivándome para la realización y culminación de este estudio. A mis hermanos, Javier y Daleska, por impulsarme cada día a ser mejor y poder cumplir todas mis metas, los amo. A mis familiares por todos sus consejos brindados, que aun estando lejos los llevo en mi mente y mi corazón; y a mis amigos por ser mis acompañantes de aventuras. A mi compañera Cesia, por compartir una amistad tan valiosa conmigo, ser mi soporte en todo momento, quien deposito su confianza en mí para acompañarla en este camino y conseguir este logro tan anhelado a base de esfuerzo y dedicación.

Andrea Lucinda Rosa Obeso Orbegozo

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios, por permitirnos culminar nuestra formación profesional, brindarnos la sabiduría e inteligencia para realizar el presente informe de investigación.

A nuestros padres y hermanos, por ser nuestro soporte y apoyarnos incondicionalmente, por nunca dejar de creer y confiar en nosotras; sin ustedes no sería posible este logro.

A nuestros familiares y amigos, que estuvieron para nosotras y que hoy comparten nuestros logros.

A nuestro asesor, el Dr. Augusto Castillo Calderón por la confianza brindada en todo momento, por sus enseñanzas, consejos y orientación para poder realizar y culminar de la mejor manera este proyecto.

Al personal técnico y profesional del IITA por su apoyo brindado para realizar los ensayos experimentales; también a los profesionales de los laboratorios de Química Orgánica, Operaciones Unitarias Agroindustriales, Composición de Productos Agroindustriales y Nutrición y Toxicología, por su paciencia y tiempo.

Gracias a la Universidad Nacional del Santa que hizo posible realizar este sueño y al jurado que tuvo la responsabilidad de evaluar este trabajo; por tanto, expresamos nuestra gratitud mediante este informe de investigación para lograr obtener el título profesional de ingeniera agroindustrial.

Karol Cesia Zavaleta Pejerrey y Andrea Lucinda Rosa Obeso Orbegozo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	18
ABSTRACT	19
I. INTRODUCCIÓN	20
II. MARCO TEÓRICO	26
2.1 Aceite de pescado.....	26
2.1.1 Aceite semirefinado de anchoveta	27
2.2 Ácidos Grasos	31
2.2.1 Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega-3 (ω -3).....	32
2.3 Lipasas.....	34
2.3.1 Lipase A “Amano” 12.....	35
2.3.2 Lipase AY “Amano” 30SD.....	35
2.3.3 Lipase DF “Amano” 15	36
2.4 Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados.....	38
2.4.1 Hidrólisis.....	39
2.4.2 Hibernación del aceite hidrolizado	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1 Lugar de ejecución	42
3.2 Materiales, equipos e instrumentos	42
3.2.1 Materia prima.....	42
3.2.2 Enzimas.....	42
3.2.3 Reactivos.....	43
3.2.4 Instrumentos.....	43
3.2.5 Equipos	44
3.3 Métodos.....	45
3.3.1 Caracterización del aceite semi-refinado de anchoveta.....	45
3.3.2 Determinación de la actividad lipídica	48
3.3.3 Determinación de los parámetros cinéticos	53

3.3.4	Hidrólisis enzimática	57
3.3.5	Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados	62
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1	Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta	63
4.2	Determinación del rango de linealidad y actividad enzimática de las lipasas.....	67
4.2.1	Efecto de la temperatura	67
4.2.2	Rango de linealidad de las lipasas	69
4.3	Caracterización cinéticamente las lipasas mediante la determinación de los parámetros cinéticos.....	76
4.3.1	Parámetro cinético de la lipasa AY “Amano” 30SD	76
4.3.2	Parámetro cinético de la lipasa A “Amano” 12	78
4.3.3	Parámetro cinético de la lipasa DF “Amano” 15	80
4.4	Determinación del grado de hidrólisis de las diferentes concentraciones de enzimas lipasas en el aceite semi-refinado de anchoveta	82
4.4.1	Diseño experimental de Taguchi	82
4.4.2	Diseño experimental de Box-Behnken	85
4.4.3	Optimización del proceso de hidrólisis enzimática	91
4.5	Concentración de ácidos grasos poliinsaturados	92
4.5.1	Ensayos experimentales para determinar composición de ácidos grasos.....	92
V.	CONCLUSIONES.....	97
VI.	RECOMENDACIONES.....	99
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
VIII.	ANEXOS.....	112

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1: Etapas del proceso semirefinado a partir del aceite crudo de anchoveta....</i>	<i>29</i>
<i>Cuadro 2: Parámetros de calidad del aceite semi-refinado de anchoveta.</i>	<i>30</i>
<i>Cuadro 3: Especificaciones de las lipasas comerciales</i>	<i>37</i>
<i>Cuadro 4: Especificaciones de las lipasas comerciales</i>	<i>42</i>
<i>Cuadro 5: Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos 'Km' y 'Vmáx' de la Lipasa "AY AMANO 30 SD".....</i>	<i>54</i>
<i>Cuadro 6: Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos 'Km' y 'Vmáx' de la Lipasa "A AMANO 12".....</i>	<i>55</i>
<i>Cuadro 7: Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos 'Km' y 'Vmáx' de la Lipasa "DF AMANO 15".....</i>	<i>56</i>
<i>Cuadro 8: Diseño estadístico experimental.....</i>	<i>58</i>
<i>Cuadro 9: Diseño experimental de Taguchi</i>	<i>59</i>
<i>Cuadro 10: Diseño experimental de Box-Behnken</i>	<i>60</i>
<i>Cuadro 11: Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta</i>	<i>63</i>
<i>Cuadro 12: Composición de ácidos grasos del aceite semirefinado de anchoveta.....</i>	<i>65</i>
<i>Cuadro 13: Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa AY "Amano" 30SD.....</i>	<i>76</i>
<i>Cuadro 14: Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa A "Amano" 12</i>	<i>78</i>
<i>Cuadro 15: Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa DF "Amano" 15</i>	<i>80</i>
<i>Cuadro 16: Resultados experimentales del % de grado de hidrólisis en los ensayos del diseño experimental de Taguchi.....</i>	<i>82</i>

Cuadro 17: <i>Análisis de varianza para el % de grado de hidrólisis en base al tipo de enzima.....</i>	83
Cuadro 18: <i>Comparaciones del tipo de enzima mediante la prueba de Tukey</i>	83
Cuadro 19: <i>Resultados experimentales del % de grado de hidrólisis con la lipasa DF Amano 15 en los ensayos del diseño experimental de Box-Behnken</i>	85
Cuadro 20: <i>Análisis de varianza del modelo de respuesta del % de grado de hidrólisis con la lipasa DF Amano 15.....</i>	86
Cuadro 21: <i>Optimización de respuesta del proceso de hidrólisis enzimática.....</i>	91
Cuadro 22: <i>Grado de hidrolisis (%) teórico y experimental.</i>	91
Cuadro 23: <i>Ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis</i>	92
Cuadro 24: <i>Perfil de ácidos grasos de los ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis</i>	93
Cuadro 25: <i>Variación de AGPI de los ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis.....</i>	94
Cuadro 26: <i>Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite semirefinado de anchoveta inicial y concentrado.....</i>	95
Cuadro 27: <i>Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “AY AMANO 30SD”</i>	119
Cuadro 28: <i>Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “A AMANO 12”</i>	120
Cuadro 29: <i>Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “DF AMANO 15”</i>	120
Cuadro 30: <i>Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “AY AMANO 30SD”</i>	121
Cuadro 31: <i>Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “A AMANO 12”</i>	121

<i>Cuadro 32: Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “DF AMANO 15”</i>	<i>122</i>
<i>Cuadro 33: Determinación de actividad enzimática de las lipasas por cada dilución</i>	<i>122</i>
<i>Cuadro 34: Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “AY AMANO 30SD”</i>	<i>123</i>
<i>Cuadro 35: Inversas del sustrato vs velocidad</i>	<i>123</i>
<i>Cuadro 36: Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “A AMANO 12”</i>	<i>125</i>
<i>Cuadro 37: Inversas del sustrato vs velocidad</i>	<i>125</i>
<i>Cuadro 38: Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “DF AMANO 15”</i>	<i>127</i>
<i>Cuadro 39: Inversas del sustrato vs velocidad</i>	<i>127</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la obtención de aceite semirefinado de anchoveta a partir del aceite crudo	28
Figura 2. Estructura del EPA	33
Figura 3. Estructura del DHA	33
Figura 4. Mecanismo catalítico de la lipasa	38
Figura 5. Esquema del contenido del Minirreactor.....	49
Figura 6. Esquema de las diluciones de una enzima.....	50
Figura 7. Diagrama de flujo del proceso experimental para la obtención del aceite semirefinado de anchoveta concentrado	61
Figura 8. Curva de enfriamiento para la concentración de AGPI.....	62
Figura 9. Efecto de la temperatura en las lipasas.....	67
Figura 10. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano” 30SD a dilución 1:6000.....	69
Figura 11. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano” 30SD a dilución 1:7000.....	70
Figura 12. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano” 30SD a dilución 1:8000.....	70
Figura 13. Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:6000.....	71
Figura 14. Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:7000.....	72
Figura 15. Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:8000.....	72

Figura 16. Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15 a dilución 1:6000.....	73
Figura 17. Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15 a dilución 1:7000.....	74
Figura 18. Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15 a dilución 1:8000.....	74
Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa AY “Amano” 30SD.....	77
Figura 20. Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa A “Amano” 12.....	79
Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa “DF AMANO 15”.....	81
Figura 23. Gráfica de comparación del tipo de enzima mediante la prueba de Tukey.	84
Figura 24. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción de la temperatura y concentración.	88
Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción del tiempo y concentración.	89
Figura 26. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción de la temperatura y tiempo.	89
Figura 27. Proceso de obtención de aceite concentrado.....	92
Figura 28. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “AY AMANO 30SD”	124
Figura 29. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “A AMANO 12”	126
Figura 30. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “DF AMANO 15”	128

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1: Ficha técnica de las lipasas comerciales obtenidas de AMANO ENZYME.</i>	<i>112</i>
<i>Anexo 2: Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta</i>	<i>115</i>
<i>Anexo 3: Determinación del rango de linealidad y actividad enzimática de las lipasas comerciales.....</i>	<i>118</i>
<i>Anexo 4: Caracterización cinética de las lipasas comerciales mediante la determinación de sus parámetros cinéticos.....</i>	<i>123</i>
<i>Anexo 5: Determinación del grado de hidrólisis de las diferentes concentraciones de enzimas lipasas en el aceite semi-refinado de anchoveta</i>	<i>129</i>
<i>Anexo 6: Identificación y cuantificación de la concentración de EPA y DHA de la muestra hidrolizada.....</i>	<i>130</i>

RESUMEN

El estudio de la hidrólisis enzimática del aceite semi-refinado de anchoveta (*Engraulis ringens*) para obtener ácidos grasos poliinsaturados (AGPI n-3) con fines de suplemento alimenticio cada vez cobra mayor importancia. El objetivo de la investigación fue evaluar las lipasas AY “Amano” 30SD, A “Amano” 12 y DF “Amano” 15 para la obtención de AGPI, considerando como variables independientes a la concentración de enzima (150, 300 y 450 U/mL), temperatura (40, 50 y 53 °C) y tiempo de reacción (12, 30 y 48 h). Se utilizó el diseño experimental de Taguchi y la característica de regioespecificidad de las lipasas para encontrar la lipasa de mayor actividad. Posteriormente se realizó un diseño experimental de Box-Behnken en el que se determinó que utilizando la lipasa DF “Amano” 15 seleccionada a condiciones óptimas de concentración de enzima (450 U/mL), temperatura (40 °C) y tiempo de reacción (48 h) se logró obtener un grado de hidrólisis de 36.27%; alcanzando un aumento de 4.81%, del contenido de AGPI n-3. Concluyéndose que el aumento de AGPI n-3 se debió al incremento de un 4.56% de EPA y DHA.

Palabras claves: *aceite de anchoveta, lipasa amano, regioespecificidad, AGPI.*

ABSTRACT

The study of the enzymatic hydrolysis of semi-refined anchovy oil (*Engraulis ringens*) to obtain polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) with dietary supplement fines is becoming increasingly important. The objective of the research was to evaluate the lipases AY “Amano” 30SD, A “Amano” 12 and DF “Amano” 15 for obtaining PUFA, considering the enzyme concentration (150, 300 and 450 U/mL) as independent variables, temperature (40, 50 and 53 °C) and reaction time (12, 30 and 48 h). The Taguchi experimental design and the regiospecificity characteristic of lipases were used to find the lipase with the highest activity. Subsequently, a Box-Behnken experimental design was carried out in which it is ensured that using the lipase DF “Amano” 15 selected at optimal conditions of enzyme concentration (450 U/mL), temperature (40 °C) and reaction time (48 h) a degree of hydrolysis of 36.27% was obtained; reaching an increase of 4.81% in the n-3 PUFA content. Concluding that the increase in n-3 PUFA was due to a 4.56% increase in EPA and DHA.

Keywords: *anchovy oil, amano lipase, regiospecificity, PUFA.*

I. INTRODUCCIÓN

Hasta el día de hoy el aceite de pescado es considerado un producto de gran valor nutricional ya que contiene un alto contenido de omega-3, lo cual lo hace valioso y genera una mayor demanda de obtener este producto en la industria (Lee *et al.*, 2008). El aceite de pescado posee ácidos grasos ω -3 de cadena extensa como, el EPA y DHA los cuales son apreciados por sus grandes efectos beneficiosos en la salud (Hibbeln *et al.*, 2006). Estas propiedades beneficiosas, se encuentran científicamente demostradas y recomendadas por la OMS, OPS y FAO (Akabas & Deckelbaum, 2006).

El consumo del EPA se beneficia asociándose primordialmente con la protección de la salud cardiovascular (Breslow, 2006). Su consumo diario disminuye los triglicéridos y el colesterol, estos son un factor fundamental de riesgo cardiovascular (Hennekens *et al.*, 1998). A su vez el consumo de DHA es elemental para la formación y función del sistema nervioso y visual (Valenzuela y Nieto, 2003); permite el trabajo neuronal (Salem *et al.*, 2001); protección de las neuronas cerebrales, entre otras patologías del sistema nervioso (Valenzuela, 2009).

Recientemente, debido al creciente interés de productos naturales en la industria alimentaria, se ha implementado el uso de enzimas lipasas en la aplicación de grasas y aceites en lugar de productos químicos tradicionales. A escala industrial este despierta un gran interés debido a su disponibilidad y ventajas en relación a los catalizadores químicos, mejor especificidad, menor consumo de energía y mayor velocidad de reacción. Siendo estas enzimas solubles en agua, operando en interfaces lípido-agua (González *et al.*, 2010) y siendo favorables ya que son menos costosas y requieren menos tiempo (Oztürk, 2001).

En cuanto a la hidrólisis enzimática por medio de lipasas va en aumento, gracias a su eficiencia, especificidad, condiciones amigables y controlables en su interacción con los sustratos; son menos agresivas con el producto y medio ambiente; siendo esta una buena alternativa de reemplazo a los métodos tradicionales. Por lo tanto, en esta investigación se plantea como objetivo principal evaluar las lipasas en la hidrólisis de aceite semirefinado de anchoveta determinando las condiciones óptimas del proceso para la obtención de AGPI a pequeña escala, logrando así impulsar el uso de lipasas a escala industrial.

1.1.Objetivos

1.1.1. Objetivo General

- Evaluar las lipasas en la hidrólisis de aceite semirefinado de anchoveta determinando las condiciones óptimas del proceso para la obtención de AGPI.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el aceite semirefinado de anchoveta.
- Determinar el rango de linealidad y actividad enzimática de las lipasas.
- Caracterizar cinéticamente las lipasas.
- Determinar las óptimas variables del proceso de hidrólisis enzimática.
- Determinar la concentración de AGPI de la muestra óptima.

1.2.Hipótesis

La lipasa “DF Amano 15” a óptimas condiciones de variables, alcanzará un grado de hidrólisis del 20% y una concentración de 2% de AGPI en base EPA y DHA.

1.3. Variables

1.3.1. Variables Independientes

- Concentración de enzima (150, 300 y 450 U/mL).
- Temperatura (40, 50 y 53°C).
- Tiempo de reacción (12, 30 y 48 horas).

1.3.2. Variables Dependientes

% Grado de hidrólisis.

1.4. Antecedentes

Según Akhter *et al.*, (2015) plantearon como objetivo investigar el efecto del uso de diferentes productos químicos para la estabilización del salvado de arroz en la enzima lipasa. Su tipo de metodología es aplicada con diseño experimental por métodos con respecto a diferentes productos químicos y concentración para controlar la actividad de la enzima lipasa y, en última instancia, maximizar su recuperación de aceite del salvado de arroz durante 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente, determinado que el uso de ácido clorhídrico ayuda enormemente controlando la actividad de la enzima lipasa y reduce el porcentaje de FFA mientras que las otras sustancias químicas utilizadas en este estudio (ácido fosfórico, ácido acético, metabisulfito de sodio) no lograron controlar el aumento del contenido de ácidos grasos libres. Concluyendo así que el ácido clorhídrico a una concentración de 30mL/Kg da los mejores resultados en la estabilización del salvado de arroz de la enzima lipasa durante el almacenamiento de 60 días.

Bhandari *et al.*, (2017) plantearon para su investigación el estudio cinético del aceite de atún indio catalizado por Candida Rugosa Lipasa (CRL) en un sistema de solvente bifásico y utilizando para la hidrólisis, la inhibición del producto de segundo orden para el ajuste del modelo cinético, con un tipo de investigación aplicada y diseño experimental por triplicado con diferentes parámetros de reacción variando solo un parámetro de reacción a la vez y manteniendo constantes los demás parámetros. Concluyen así que las condiciones de reacción más adecuadas se encontraron como pH 6.5, T° 35°C velocidad de agitación 800 rpm, 40mg cantidad de enzima, relación de aceite a disolvente 1:1 (p/v) y 1:10 (p/v) relación de aceite a agua el valor de las constantes cinéticas se estimó como $K_m = 12 \mu\text{moles de FFA/mL}$, $K_{i1} = 2.0 \times 10^{-8} \mu\text{moles de ácidos grasos libres (FFA)/mg enzima} \cdot \text{h}$, $K_{i2} = 0,078 \mu\text{moles de ácidos grasos libres (FFA)/mg de enzima} \cdot \text{h}$ y $K_2 = 652,7 \mu\text{moles FFA/mg enzima} \cdot \text{h}$ y valores de R^2 , RMSE y MAPE resultó ser 0,959 y 60,51 y 11,41, respectivamente.

Liu *et al.*, (2020) plantearon como objetivo la oxidación de lípidos durante el proceso de extracción, se estudió seis parámetros operativos incluido el pescado, uso de antioxidantes, adición de agua, tipos de enzimas, la concentración de enzimas y el tiempo de hidrólisis, sobre su efecto y la composición nutricional del aceite extraído enzimáticamente de los subproductos del salmón del Atlántico cultivado. Su tipo de metodología es aplicada con diseño experimental haciendo uso de tres proteínas, Alcalase 2.4L (actividad: 2,4 AU-A/g) y Flavourzyme (actividad: 500 LAPU / g) fueron comprado de Sigma – Aldrich, SEBPro FL100 (actividad: 100,000 HUT/g) se obtuvo de la innovación enzimática. El antioxidante Dadex AR-HS (extracto de romero, ácido ascórbico y aceite de girasol) fue amablemente proporcionado por Caldic Canada Inc. Ácido hidroclicórico concentrado y los gránulos de hidróxido de sodio se adquirieron de Fisher Scientific; dando como resultados las condiciones de extracción

optimizadas para ácidos grasos omega-6 PU con la adición de agua, con la adición de antioxidantes naturales y 4 h de hidrolización usando vísceras de salmón. Concluyendo así que la adición de antioxidantes aumentó significativamente en el contenido promedio de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 de 16.2 a 17.1%, disminuyendo las cantidades de EPA y DHA en el aceite de víscera debido a la actividad proantioxidante del ácido ascórbico.

Morales *et al.*, (2018) plantearon como objetivo de este trabajo producir diacilglicerol (DAG) y monoacilglicerol (MAG) con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Hidrólisis de sardina mediada por lipasa de *Rhizomucor miehei*. El sistema fue modelado mecánicamente para predecir la evolución temporal de la concentración de triacilglicerol, DAG, MAG y ácidos grasos libres (FFA) y la concentración de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La liberación del primer ácido graso del triacilglicerol fue independiente del grado de insaturación. Al contrario, la hidrólisis del segundo se vio muy afectado por el grado de insaturación, siendo los AGPI los ácidos grasos que presentaron mayor resistencia a la hidrólisis. Concluyendo así que el porcentaje de MAG fue máximo (7% en moles) en actividades de agua más bajas, mientras que el DAG el contenido se vio favorecido en actividades de agua más altas (35% en moles), logrando una concentración 2 veces mayor de DHA.

Finalmente, Sharma *et al.*, (2013) plantearon como objetivo determinar la fuerza comparativa de dos lipasas como *Candida dracea* lipasa (CCL) y *Candida rugosa* lipasa (CRL), para ello utilizaron la hidrólisis enzimática comparativa del aceite de hígado de bacalao con ambas enzimas, con un tipo de investigación aplicada en un sistema disolvente bifásico para la producción de ácidos grasos libres (FFA). El rendimiento de FFA del aceite de hígado de bacalao se estudió variando las

condiciones de reacción adecuadas, concluyendo así que la enzima CCL tiene mayor actividad que la enzima CRL. La enzima CRL dio una velocidad de reacción comparativa más alta $V_{\max} = 42.7$ moles de FFA formados/mL) mientras que CCL estaba más selectiva $K_M = 9.1$ moles de FFA formado/mL) con activación ($E=21,3\text{kJ/mol}$) para la hidrólisis de aceite de hígado de bacalao. La caracterización fisicoquímica de ambas lipasas respalda la investigación en cuanto a CCL tiene una buena actividad para la hidrólisis de triglicéridos con el doble de superficie ($17,9\text{ m}^2/\text{g}$), reflejando comparativamente más posibilidades de colisión entre el sustrato y los sitios activos de la lipasa.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aceite de pescado

El aceite de pescado es un producto de alto valor nutricional a nivel industrial debido a su contenido de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, dentro de los cuales se encuentran: EPA, DPA y DHA (Grompone, s.f.). En la actualidad este producto cuenta con una alta demanda en el mercado, debido a que sus ácidos grasos EPA y DHA presentan propiedades profilácticas y terapéuticas (Nasiff y Meriño, 2003).

Este aceite posee diversas aplicaciones, como en la industria de la margarina, grasas de pastelería y aceites comestibles; así mismo, dada la diversidad de sus propiedades resultan útiles para elaborar barnices y aceites secantes. En las últimas décadas se viene empleando los ácidos grasos de tipo omega en la medicina e investigación científica. (Valenzuela, 1999).

Entre los distintos tipos de aceite de pescado encontramos al aceite crudo, semirefinado y refinado.

El *aceite crudo* es aquel obtenido por procedimientos mecánicos de separación y centrifugación en la producción de harina de pescado, eliminando gran parte de los sólidos en suspensión y el agua. Este aceite contiene en promedio 28% de ácidos Omega-3 de los cuales es el 18% de EPA y 10% de DHA; entre sus propiedades organolépticas posee un color marrón, sabor y olor característico a pescado que muchas personas no toleran siendo intolerable para muchas personas, para modificar estas características este aceite pasa por diversos procesos ya sea la obtención de aceite semi-refinado o refinado, con la finalidad de disminuir la

intensidad de sus características sensoriales y a su vez aumentar su contenido promedio de EPA y DHA. (Global Organization for EPA and DHA, 2020).

Otro tipo es el *aceite semirefinado*, este es el aceite crudo que ha sido sometido a procesos de neutralización, blanqueado y filtrado, hasta alcanzar los requisitos específicos en la norma correspondiente. Este tipo de aceite contiene en promedio 33,47% de ácidos Omega-3 de los cuales es el 20,94% de EPA y 12,53% de DHA (Global Organization for EPA and DHA, 2020).

Por último, el *aceite refinado* es obtenido tras un proceso de blanqueado, destilado, winterizado y deodorizado al cual se ha sometido el aceite crudo. Contiene en promedio 70% de ácidos Omega-3 de los cuales es el 40% de EPA y 30% de DHA. (Global Organization for EPA and DHA, 2020).

2.1.1 Aceite semirefinado de anchoveta

2.1.1.1 Proceso de aceite semirefinado de anchoveta

Para el proceso del aceite semirefinado de anchoveta a partir del aceite crudo, se inicia comúnmente agitando y mezclando rápidamente el aceite con una solución alcalina, luego se deja en reposo por aproximadamente 3 horas, al terminar este tiempo se vierte el precipitado jabonoso formado en la reacción, luego con la finalidad de eliminar posibles residuos de jabones sódicos pasa a una etapa de lavado en el cual se le añade agua caliente. Posterior a ello pasa por un blanqueado en el cual se emplea comúnmente arcillas naturales y activadas, con la finalidad de reducir los pigmentos naturales y materiales colorantes del aceite, así como también eliminar aquellos mucílagos en suspensión que pudieron haber quedado en la etapa previa. (Windsor y Barlow, 1984).

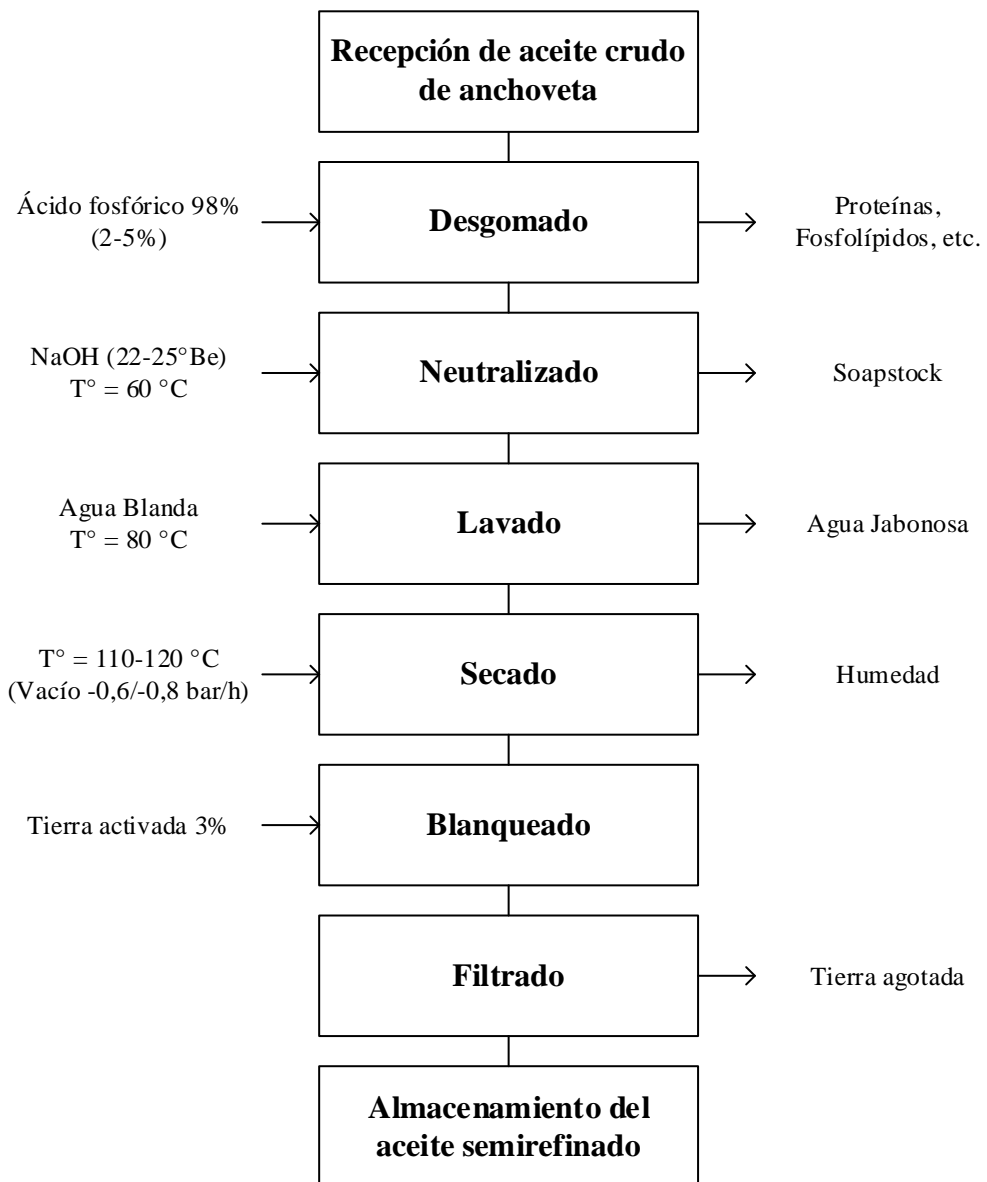


Figura 1. Diagrama de flujo de la obtención de aceite semirefinado de anchoveta a partir del aceite crudo

Fuente: (Encinas, 2021)

Cuadro 1: *Etapas del proceso semirefinado a partir del aceite crudo de anchoveta*

Etapas	Procedimiento	Finalidad	Referencia
Desgomado	El aceite crudo es calentado hasta aproximadamente 80°C y se mezcla con ácido fosfórico, se utiliza un tanque con agitación mecánica y sistemas de vapor. Las gomas llegan a ser hidratadas (flóculos) y apartadas del aceite.	Modificación de fosfolípidos, pigmentos, proteínas, para la extracción en fase acuosa	Robalino (2009); Windsor y Barlow (1984); Roldán (2016); Campos (2017).
Neutralizado	Se neutraliza con solución de hidróxido de sodio (22-25°Be), a una temperatura de 60°C con agitación vigorosa. Finalizada la agitación, se eleva a 80°C, para facilitar la separación del aceite y Soapstock. Luego se enfría y se separa la fracción aceitosa con un filtro centrífugo.	Eliminación de los ácidos grasos libres del aceite, con la finalidad de reducir la acidez hasta los límites aceptables.	
Lavado	En este proceso se le agrega agua a una temperatura de 80°C con agitación constante por un corto tiempo en proporción 5:1, aceite: agua. Al finalizar se retira el agua de lavado.	Eliminación de los restos de jabón.	
Secado	El aceite se calienta de 110 - 120°C con un vacío de -0,6/-0,8 bar/h.	Evaporación de agua	
Blanqueado	En este proceso se le adiciona una sustancia adsorbente (tierra activada al 3%) con agitación lenta. Se realiza en un tanque a una temperatura de 100-121°C.	Eliminación de los pigmentos y restos de jabón.	
Filtrado	La filtración del aceite se efectúa por un tiempo de 5 minutos para un volumen inicial de 60 mL, con un vacío de 280 a 500 mmHg.	Eliminación de restos de tierra de blanqueo gastado.	

2.1.1.2 Parámetros de calidad

En base a las normas de calidad los parámetros que se deben tener en cuenta son los siguientes descritos en la Norma Técnica Peruana 312.003:1970 (Revisada 2010).

Cuadro 2: *Parámetros de calidad del aceite semi-refinado de anchoveta.*

Parámetro	Valor
Densidad a 25 °C	0.92 - 0.93
Color Gardner	Máx. 9
Acidez libre expresada como ácido oleico	Máx. 0.50%
Índice de saponificación	186-198
Índice de Yodo (Wijs)	175-198
Contenido de Humedad	Máx. 0.20%
Contenido de impurezas insolubles	Máx. 0.10%
Contenido de materia insaponificable	Máx. 1.50%

Fuente: NTP 312.003:1970 (Encinas, 2021)

2.2 Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son los principales constituyentes de los lípidos, de gran longitud en cuanto a sus cadenas hidrocarbonadas, en un extremo con un grupo carboxilo, los cuales pueden ser saturados como insaturados. Su identificación se basa en la composición de AG como también de la cantidad de carbonos y de la posición en la que se encuentran sus dobles enlaces conforme a lo que demanda el sistema IUPAC. (Uauy y Gerber, 2012).

En los ácidos grasos omega se encuentra el ω -3 y ω -6; se caracterizan por tener en su grupo funcional de ácido carboxílico un átomo de carbono en la parte terminal (Chamorro *et al.*, 2016). Son esenciales para el organismo ya que desempeñan numerosas funciones fisiológicas (Lecerf y Vancassel, 2012).

Los ácidos grasos se clasifican de acuerdo a sus grupos omega, cuando la fórmula no tiene grupos ω , o dobles enlaces se trata de un *ácido graso saturado* (AGS), por lo tanto, poseen enlaces simples; los que tienen 8 carbonos se encuentran en estado líquido principalmente en la grasa de la leche y los que tienen a partir de 12 carbonos son sólidos con puntos de fusión de nivel elevado ya que este aumenta con la longitud de la cadena; los más usuales son el palmítico y esteárico. (Ixtaina, 2010). Por otro lado, si estos poseen en su formulación grupos omegas o dobles enlaces se trata de un *ácido graso insaturado* (AGI), pudiendo ser monoinsaturado (1ω), diinsaturado (2ω) o poliinsaturado (3ω o más) (Robalino, 2009). En el caso de los monoinsaturados poseen en su estructura una sola insaturación es decir un solo doble enlace; uno de los más encontrados en la mayoría de grasas naturales es el ácido oleico también conocido ω -9. (Navas, 2010). En cuanto a los poliinsaturados encontramos a los Omega-3 (ω -3) y Omega-6 (ω -6), que son

esenciales para el ser humano debido a sus diversos beneficiosos (Simopoulos, 2001).

2.2.1 Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega-3 (ω -3)

Los AGPI ω -3 se localizan en su mayoría estructuralmente en los fosfolípidos (posición sn-2) de las membranas celulares (Araya *et al.*, 2004). Son de cadena larga y resultan ser esenciales para el organismo del ser humano ya que este no puede sintetizarlo (Alonso y Chuqui, 2019). Dentro de estos ácidos grasos poliinsaturados son de suma importancia el EPA y DHA que se encuentran en los animales principalmente de origen marino como el pescado, y el ALA que se encuentra en algunos vegetales como el aceite de linaza. (Kashiwagi y Huang, 2012).

Dentro de sus beneficios este ayuda al crecimiento de los tejidos cerebrales como al buen desarrollo del mismo, y disminuye los problemas cardiovasculares. Los primeros informes acerca de estas propiedades se dieron en los años 60 por Bang y Dyerberg a raíz de una baja incidencia de infarto en Groenlandia, gracias a que la dieta de los pobladores se basaba en animales marinos. (Valenzuela *et al.*, 2011). Siendo así el inicio de diversos estudios referentes a los beneficios del ω -3, los cuales se siguen investigando hasta la actualidad (De Cateriana, 2011).

Existen dos ácidos grasos poliinsaturados de mayor relevancia presentes en las especies marinas los cuales son los ácidos Docosahexaenoico (DHA) y Eicosapentaenoico (EPA), que en los últimos años han llamado la atención a la comunidad científica debido a que aportan múltiples beneficios a la salud.

2.2.1.1 EPA

El Ácido Eicosapentaenoico tiene como principal beneficio aquellos relacionados al sistema cardiovascular ya que ayuda a controlar la circulación adecuada en la sangre, y generar plaquetas que ayuden a reforzar las arterias y venas (Roldán, 2016). La ingesta diaria reduce el colesterol sanguíneo, además baja la presión arterial y tiene efectos antitrombóticos (Sanhueza *et al.*, 2009).

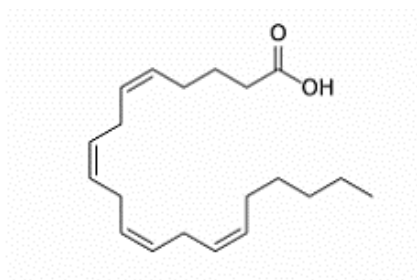


Figura 2. Estructura del EPA

Fuente: Andamayo (2021)

2.2.1.2 DHA

El Ácido Docosahexaenoico es extremadamente beneficiosa en la función neuronal del ser humano (Aranceta y Gil, 2010), ya que ayuda al desarrollo del tejido nervioso y a la salud visual, evitando enfermedades cardiovasculares, retardando el Alzheimer y ayudando a mantener el ojo lubricado (Andamayo, 2021).

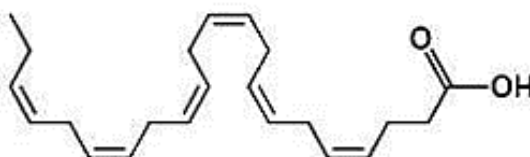


Figura 3. Estructura del DHA

Fuente: Andamayo (2021)

2.3 Lipasas

Estas son hidrolasas de serina definidas como triacilglicerol acilhidrolasas, capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga, con cadenas mayores a 10 átomos de carbono, siendo esta una de las características que las hace distintas a las estereasas (Casas *et al.*, 2012). Estas son producidas tanto por animales, vegetales y microorganismos, sin embargo, este último en mención toma gran importancia debido a su síntesis que presentan sus enzimas las cuales llegan a catalizar diferentes reacciones, son estables con los solventes orgánicos e independiente de cofactores, además una de sus características es que estas pueden reaccionar con diferentes sustratos (Tan *et al.*, 2015). Una de las características en la que se diferencia esta de las demás es que requiere para su catálisis una interface orgánico-acuosa (Hasan *et al.*, 2009).

Uno de los orígenes de estas lipasas fundamentales en este estudio son las de origen fúngico estos microorganismos son encontrados en diferentes hábitats ya que estos poseen una facilidad para generar lipasas. Según Alarcón (2008) nos menciona que para producir estas lipasas se necesitan condiciones óptimas de temperatura, pH, como del medio de fermentación en base a su estructura, ya sea concentración de sales inorgánicas o fuentes de carbono mixta logrando influir en los componentes propios de la reactividad enzimática. Entre ellas encontramos las lipasas de levaduras y lipasas de hongos filamentosos en la cual entre las lipasas de levadura tenemos a las lipasas de *Candida rugosa*, *Candida antártica* y *Yarrowia Lipolytica* siendo estas las principales, luego entre las lipasas de hongos filamentosos encontramos como primera lipasa fúngica a la estructura de la *Rhizomucor miehei* expresada en *Aspergillus oryzae* quien fue la primera estructura obtenida de una lipasa fúngica.

Dentro de las lipasas que se comercializan y se utilizan en este estudio, se tiene a la Lipase A “Amano” 12, Lipase AY “Amano” 30SD y Lipase DF “Amano” 15 de origen de *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea* y *Rhizopus oryzae*, respectivamente; siendo estas de origen fúngico (Anexo 1).

2.3.1 Lipase A “Amano” 12

El *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso, se clonaron y secuenciaron dos ADN genómicos que codifican endoinulinasa (Cujilema *et al.*, 2018). Los genes de endoinulinasa, *inuA* e *inuB*, estaban formados ambos por 1.548 nucleótidos que codificaban 516 aminoácidos; que crece en la semilla de *Jatropha curca*. Su sitio activo está representado con la triada catalítica en Ser196, Asp448 y His494 (Fuentes *et al.*, 2017). Muestra selectividad posicional hacia las posiciones 1 y 3 del resto de glicerol [2-4], preferencia de sustrato para la longitud de cadena media de ácidos grasos (Zheng-Yu, 2007). La temperatura óptima según Mayel *et al.*, (2020) se encuentra a 50°C y pH óptimo de 6, según De Souza *et al.*, (2020) se encuentra a 55°C y pH óptimo de 7; en esta investigación también se tuvo en cuenta la ficha técnica del proveedor (Anexo 1A).

2.3.2 Lipase AY “Amano” 30SD

En base a las secuencias de la *Candida cylindracea*, según Lotti *et al.*, (1993) hasta la fecha cinco genómicos codificadores de lipasa en su laboratorio se han caracterizado. Las cinco secuencias AA deducidas comparten una homología del 80% las cuales contienen 534 aminoácidos (AA) y codifican supuestas proteínas maduras de 57 kDa y su sitio activo está formado por tres aminoácidos de la tríada catalítica Ser-His-Glu.

Hidroliza los ácidos grasos cortos, medios y largos de 1, 2 y 3 posiciones del triacilglicerol. (Encinas, 2021). La temperatura óptima según Encinas (2021) se encuentra a 50°C y pH óptimo de 7, según Sharma *et al.*, (2013) se encuentra a 35°C y pH óptimo de 6.5 y 7; en esta investigación también se tuvo en cuenta la ficha técnica del proveedor (Anexo 1B).

2.3.3 Lipase DF “Amano” 15

La *Rhizopus oryzae* son hongos que se encuentran en los frutos producidos por la palmera. En la década de los 80' todos los llamados *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. niveus* y *R. javanicus*, fueron considerados del mismo organismo *R. oryzae*. (Schipper, 1984). El dominio de la tapa es una estructura de α -hélice corta formada por seis aminoácidos (FRSAIT) y el sitio activo está formado por tres aminoácidos Ser145, Asp204 y His257. (López *et al.*, 2020). Esta enzima actúa hidrolizando de manera preferente las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos, siendo esta una característica importante en su regioespecificidad (Salah *et al.*, 1994) y cuenta con una secuencia de 392 aminoácidos (Beer *et al.*, 1996). La temperatura óptima según Ayinla *et al.*, (2021) se encuentra a 55°C y pH óptimo de 8, según Bhandari *et al.*, (2013) se encuentra a 35°C y pH óptimo de 7; en esta investigación también se tuvo en cuenta la ficha técnica del proveedor (Anexo 1C).

Cuadro 3: *Especificaciones de las lipasas comerciales*

Origen	Nombre comercial	Proveedor	Características	Propiedades	Fuente
Aspergillus niger	Lipase A AMANO 12	Amano Enzyme Inc.	<p>pH: 6 Temperatura: 47°C Peso kDa: 41 Actividad lipídica: 120 U/mg Secuencia de aminoácidos: 516 Centro activo: Ser196, Asp448 y His494.</p>	La lipasa muestra selectividad posicional hacia las posiciones 1 y 3 del resto de glicerol [2-4], preferencia de sustrato para la longitud de cadena media de ácidos grasos.	(Cujilema et al., 2018; Fuentes et al., 2017; Zheng-Yu, 2007)
Candida cylindracea	Lipase AY AMANO 30SD	Amano Enzyme Inc.	<p>pH: 7 Temperatura: 50°C Peso kDa: 57 Actividad lipídica: 30 U/mg Secuencia de aminoácidos: 534 Centro activo: Ser, Glu y His.</p>	Hidroliza los ácidos grasos cortos, medios y largos de 1, 2 y 3 posiciones del triacilglicerol.	(Lotti et al., 1993; Encinas & Castillo, 2021)
Rhizopus oryzae	Lipase DF AMANO 15	Amano Enzyme Inc.	<p>pH: 7 Temperatura: 35 – 40°C Peso kDa: 41 Actividad lipídica: 150 U/mg Secuencia de aminoácidos: 392 Centro activo: Ser145, Asp204 y His257.</p>	Especificación posicional para las posiciones 1 y 3 de los glicéridos e hidroliza los enlaces éster de las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos. Relativamente específico para ácidos grasos con cadena larga y mediana.	(Schipper, 1984; López et al., 2020; Salah et al., 1994; Beer et al., 1996)

2.4 Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados

A raíz de esta creciente demanda para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de omega-3, encontramos diversos métodos químicos para su concentración (Rubio *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013), estos métodos tienen un alto costo, elevadas temperaturas y generan residuos que afectan el producto final. En comparación con los procesos enzimáticos como lo es las hidrólisis catalizadas por lipasas estas tienen un excelente beneficio ya que sus condiciones de obtención son leves debido a que trabajan a bajas temperaturas, obteniendo una pureza óptima en el producto sin llevar a una desnaturalización de ácidos grasos. (Goswami *et al.*, 2012).

Estas enzimas lipasas como catalizadores naturales comparten un mismo sitio activo y actúan en enlaces éster carboxílicos catalizando la hidrólisis de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Figura 4); al ser muy fáciles de adecuarse sus usos han aumentado en la actualidad.

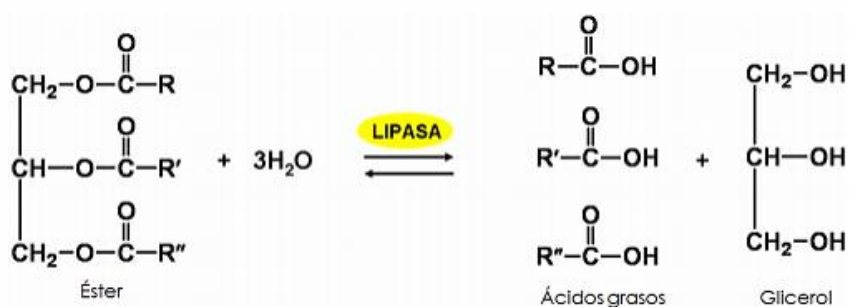


Figura 4. Mecanismo catalítico de la lipasa

Fuente: Rivas (2015)

2.4.1 Hidrólisis

Hidrólisis es la reacción que se da desde un triglicérido (éster de ácidos grasos), el cual llega a producir ácidos grasos libres (AGL), monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) y glicerol tomando una molécula de agua por cada enlace que haya sido hidrolizado. Si completa la hidrólisis, los productos obtenidos son ácidos grasos libres y glicerol. (Salaberría, 2018).

La hidrólisis enzimática es un método biológico la cual ha sido tema de investigación debido a su importancia en la metabolización de las grasas y siendo fundamental en algunas técnicas analíticas, como lo describe Kahveci & Xu (2011) las lipasas como *Candida cylindracea* (CCL), *Mucor javanicus*, *Candida rugosa* y *Aspergillus niger* posibles para utilizarse en la concentración de los AGPI ω -3, con potencial a reemplazar los métodos químicos.

2.4.1.1 Grado de Hidrólisis

Este es el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados el cual se halla mediante la división entre la concentración del hidrolizado sobre la concentración inicial multiplicado por cien, siendo un método muy simple y rápido para medir el grado de ruptura generado (Benites *et al.*, 2008).

$$\% \text{ Grado de hidrólisis} = \frac{\text{Concentración del hidrolizado}}{\text{Concentración inicial}} * 100$$

2.4.1.2 Factores que influyen en las reacciones catalizadas por lipasas

Durante el proceso de hidrólisis, el rendimiento con respecto a la actividad enzimática se ve influenciado por diversos factores entre ellos el contenido de agua, temperatura, pH y disolvente (Goswami *et al.*, 2012).

En cuanto al *contenido de agua* para la reacción catalizada por enzimas se necesita un cierto nivel de agua para mantener la molécula de enzima y su actividad; también contribuye a la estabilidad de la proteína como a la polaridad del sitio activo. (Bailey, 2005).

Por otro lado, cuando la *temperatura* aumenta también surge un aumento en la velocidad de reacción, sin embargo, si sobrepasa los límites en la reacción lipídica este puede afectar la estructura y la conformación molecular de la lipasa (Goswami *et al.*, 2012); es por ello que a elevadas temperaturas impide su acción catalítica comprometiendo así el aumento de la actividad con la desnaturalización térmica.

Con respecto al *pH*, cuando esta presenta variaciones extremas puede afectar a la estructura y modificar la actividad, pues cada enzima es catalíticamente activa en un sólo rango de pH. En esta investigación las variaciones extremas de pH no se aplican ya que a escala industrial son controladas en un rango de 6.5-6.8 (Bailey, 2005), los cuales son los valores de agua que se tienen en cuenta en el proceso de hidrólisis.

Los disolventes orgánicos influyen en la reacción catalítica de las lipasas debido a su polaridad. En esta investigación no se tomará en cuenta ya que es un proceso destinado a la elaboración de productos de consumo humano y su ausencia facilita el procesamiento de aguas y ahorro de costes (Cachago, 2015).

2.4.2 Hibernación del aceite hidrolizado

Lo fundamental en este proceso es separar los ácidos grasos saturados que se liberaron como resultado de la hidrólisis, esto se logra debido a la diferencia en el punto de fusión de los AG, y depende primordialmente del grado de insaturación y longitud de la cadena de los AG (Bonilla & Hoyos, 2018). Por lo tanto, este método es apropiado para obtener concentrados de AGPI ω -3, debido a que este proceso comprende la cristalización parcial del aceite teniendo un control de enfriamiento, y finalizando en una etapa de filtración.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

Para lograr la ejecución del presente proyecto de investigación se utilizaron las siguientes instalaciones de la Universidad Nacional del Santa:

- Laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- Laboratorio de Nutrición y Toxicología de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial (IITA).

3.2 Materiales, equipos e instrumentos

3.2.1 Materia prima

El aceite de pescado semi-refinado de anchoveta fue adquirida de la empresa “SHEKINA COMPANY SAC” ubicado en Jr. Huancavelica 1027, PJ Florida Baja, Chimbote; en el mes de enero del año 2023.

3.2.2 Enzimas

Las lipasas comerciales A “Amano” 12, AY “Amano” 30 SD y DF “Amano” 15, fueron adquiridas de la empresa AMANO ENZYME.

Cuadro 4: *Especificaciones de las lipasas comerciales*

Características	Lipasas comerciales		
	A “Amano” 12	AY “Amano” 30 SD	DF “Amano” 15
Enzima aislada	Aspergillus niger	Candida cylindracea	Rhizopus oryzae
Actividad lipídica (U/g)	120 000	30 000	150 000
pH	4.0 – 7.0	3.0 – 8.0	6.0 – 7.0
Temperatura (°C)	50 - 60	40 - 50	35 - 40

3.2.3 Reactivos

- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Fenolftaleína
- Etanol (96%)
- Buffer citrato-fosfato pH 6 y pH 7
- Hidróxido de Potasio (KOH)
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Solución Hanus
- Yoduro de Potasio al 15% (KI)
- Cloroformo (CHCl₃)
- Almidón (1%)
- Tiosulfato de Sodio 0.1N (Na₂S₂O₃)
- Ácido Acético Glacial (CH₃COOH)
- P-anisidina (CH₃O.C₆H₄.NH₂)
- Hexano (C₆H₁₄)
- Isooctano (C₈H₁₈)
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Trifloruro de Boro (BF₃)
- Metanol (CH₃OH)
- Nitrógeno (gas)

3.2.4 Instrumentos

- Tubos de ensayo con tapa rosca.
- Bureta de 10 y 25 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 25 mL.

- Pipetas pasteur.
- Matraz Erlenmeyer de 100 y 150 mL.
- Vaso de precipitación de 25, 100 y 400 mL.
- Probeta de 25 y 100 mL.
- Fiolas de 5, 25, 100 y 1000 mL.
- Varilla de vidrio.
- Termómetro digital.
- Viales de 2 mL
- Septas para viales.
- Jeringas de 20 mL.
- Fuente de nitrógeno seco, con válvula reguladora.

3.2.5 Equipos

- Balanza Analítica: Precisa Gravimetrics AG 321 LX.
- Balanza Digital de precisión: Precisa XB-320M.
- Baño María Digital de Recirculación WCB-11.
- Agitador Magnético: Thermolyne Nuova II Stirrer S18525.
- Minirreactor: vaso de 500 mL.
- Refrigerador.
- pH metro: Orion Star A211 Thermo Scientific.
- Shaker Sartorius Stedim biotech CERTOMAT® IS Fisher Scientific.
- Agitador Orbital Digital LAB-LINE 4628.
- Cabina Extractora de Gases: Modelo CHC.
- Centrífuga: Borosil (Germany).
- Espectrofotómetro digital UV-VISIBLE: JASCO V-670.

- Cromatógrafo de Gases: SHIMADZU, Modelo GC- 2010
 - Detector de Ionización de Flama (FID).
 - Muestreador automático Shimadzu AOC- 20Si.
 - Gas portador de Helio.
 - Columna capilar para cromatografía: Sílice SP Rt-2560 (100m x 0,25mm con 0,25µm film), y volumen de inyección fue de 1µl.

3.3 Métodos

3.3.1 Caracterización del aceite semi-refinado de anchoveta

A. Índice de Acidez

Se realizó según el Método oficial AOCS Cd 3d-63, el cual nos informa sobre la cantidad de ácidos grasos libres (FFA) que contiene el aceite, siendo de esta manera expresada en porcentaje de ácido oleico contenido en el aceite semirefinado de anchoveta.

Para el cálculo se utilizó las siguientes ecuaciones (1) y (2):

$$Acidez \left(\frac{mg \text{ KOH}}{g \text{ de aceite}} \right) = \frac{N * V * Peq (KOH)}{W_m} \quad (1)$$

$$\% Acidez \left(\frac{g \text{ de acido oleico}}{100 g \text{ de aceite}} \right) = \frac{N * V * Pmeq}{W_m} * 100 \quad (2)$$

Dónde:

N = Normalidad del Hidróxido de Potasio (0.1)

V = Volumen gastado en la titulación de KOH

Peq = Peso equivalente KOH (56.1 g/mol)

Pmeq = Peso miliequivalente del ácido oleico (0.282 g/mol)

Wm = Peso de muestra (g)

B. Índice de Saponificación

Se determinó mediante el método oficial AOCS Cd 3-25, el cual esta expresada por la cantidad de mg de KOH que se necesita para lograr saponificar 1g de grasa.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (3):

$$IS \left(\frac{mg\ KOH}{g\ de\ aceite} \right) = \frac{(B - S) * N * 56.1}{W_m} \quad (3)$$

Dónde:

B = Volumen en mL de solución de HCl 0.1 N utilizados en el blanco.

S = Volumen en mL de solución de HCl 0.1 N utilizados en la muestra.

N = Normalidad de la solución de ácido clorhídrico (0.1)

Wm = Peso de muestra (g)

C. Índice de Peróxidos

Se realizó mediante el Método oficial AOCS Cd 8b-90, expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite, que mide su oxidación inicial.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (4):

$$IP \left(\frac{meqO_2}{kg} \right) = \frac{(S - B) * N * 1000}{W_m} \quad (4)$$

Dónde:

S = Volumen en mL de solución de Na₂S₂O₃ 0.1 N utilizados en la muestra.

B = Volumen en mL de solución de Na₂S₂O₃ 0.1 N utilizados en el blanco.

N = Normalidad de la solución de Tiosulfato de Sodio (0.1)

Wm = Peso de muestra (g)

D. Índice de Anisidina

Se realizó mediante el Método oficial AOCS Cd 18-90, teniendo como fundamento la interacción entre 1 gramo de aceite y la combinación del solvente y la anisidina en 100 mL. Siendo expresada como 100 veces la absorbancia a 350 nm de una solución.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (5):

$$\text{Índice de anisidina} = \frac{25 * (1.2 A_s - A_b)}{W_m} \quad (5)$$

Dónde:

A_s = Absorbancia de la solución de grasa con la reacción de p-anisidina.

A_b = Absorbancia de la solución de grasa.

W_m = Peso de muestra (g)

E. Índice de Yodo

Se realizó mediante el Método oficial AOCS Cd 1-25, este mide el grado de insaturación de los aceites; y es expresada por la cantidad de yodo que reacciona con 100 gramos de aceite o grasa. Por tanto, cuanto mayor sea el índice de yodo, mayor será la presencia de dobles enlaces en la muestra.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (6):

$$IY \left(\frac{mg \text{ I}_2}{g \text{ de aceite}} \right) = \frac{(B - S) * N * 12.69}{W_m} \quad (6)$$

Dónde:

B = Volumen en mL de solución de $Na_2S_2O_3$ 0.1 N utilizados en el blanco.

S = Volumen en mL de solución de $Na_2S_2O_3$ 0.1 N utilizados en la muestra.

N = Normalidad de la solución de Tiosulfato de Sodio (0.1).

W_m = Peso de muestra (g)

F. Determinación del Perfil de ácidos grasos

El fundamento del Método oficial AOAC 991.39 se basa en el análisis de los ácidos grasos en el aceite marino, siendo primordial los AGPI para la investigación; sus valores se manifiestan mediante el porcentaje de área (%) y se interpretan como miligramo de ácido graso por gramo de muestra (mg/g); se utilizó una columna capilar sílice SP Rt-2560 y un detector de ionización de llama (FID), teniendo en cuenta el análisis de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de 28 componentes.

3.3.2 Determinación de la actividad lipídica

El método utilizado en la presente investigación fue el análisis titrimétrico, señalado por Camacho (2014), para la cual se utilizó las enzimas lipasas “AY AMANO 30SD”, “A AMANO 12” y “DF AMANO 15”; considerando su pH de 7.0, 6.0 y 7.0, respectivamente; mencionados en la ficha técnica del proveedor AMANO ENZYME (2021).

Para determinar la temperatura de trabajo se realizó la determinación del efecto de la temperatura en las lipasas mediante la metodología descrita por Strehl Schübel-Hopf & Partner (2021), usando un rango de temperaturas (35 – 60) °C por 15 minutos.

Para este procedimiento se utilizó como sustrato la mezcla entre el aceite de oliva extra virgen y el PVA al 2% formándose así la emulsión; también se requirió del tampón citrato-fosfato a pH 6.0 y 7.0 para el uso respectivo de cada enzima considerada en su ficha técnica.

Seguidamente, se presenta el esquema del contenido del minireactor.

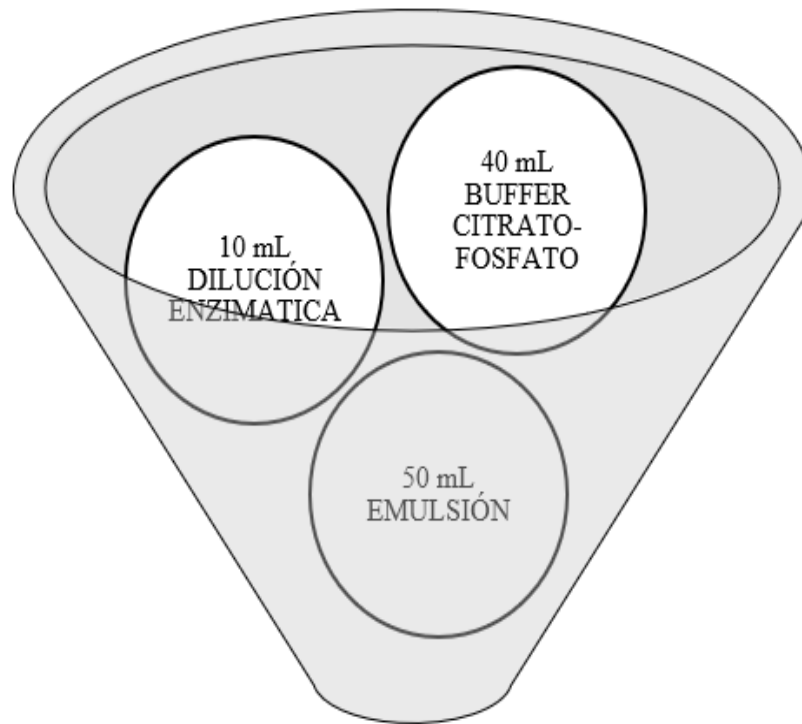


Figura 5. *Esquema del contenido del Minirreactor*

Fuente: Strehl Schübel-Hopf & Partner (2021),

A. Preparación de PVA al 2%

Se prepara la solución de PVA a concentración del 2% como lo indica el proveedor de la enzima “Amano”, siendo esta una solución necesaria para la preparación de la emulsión (sustrato).

- Se pesó 10 g de alcohol polivinílico completamente hidrolizado y se disolvió en 400 mL de agua caliente (90-100°C).
- Se licuó y agitó constantemente hasta obtener un líquido viscoso.
- Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 500mL.
- Por último, se filtró y se obtuvo la solución de PVA al 2%.

B. Preparación de la emulsión (sustrato)

Para la preparación de la emulsión se utilizó el aceite de oliva extra virgen comercial y la solución de PVA al 2%.

- Inicialmente se midió la cantidad de 75 mL de la solución PVA 2% y 25 mL de aceite de oliva extra virgen.
- Luego se licuó por 4 minutos hasta obtener una emulsión homogénea.
- Finalmente se dejó enfriar a 10°C para concentrar los ácidos grasos de la emulsión.

C. Preparación de la enzima

Para la preparación de la enzima se realizó 3 diluciones, las cuales fueron: 1:8000, 1:7000 y 1:6000.

- Se pesó 0.05 g de enzima y se disolvió en una fiola de 5 mL con agua destilada
- Se extrajo 0.1 mL de solución y se diluyó en 7.9, 6.9 y 5.9 mL respectivamente.

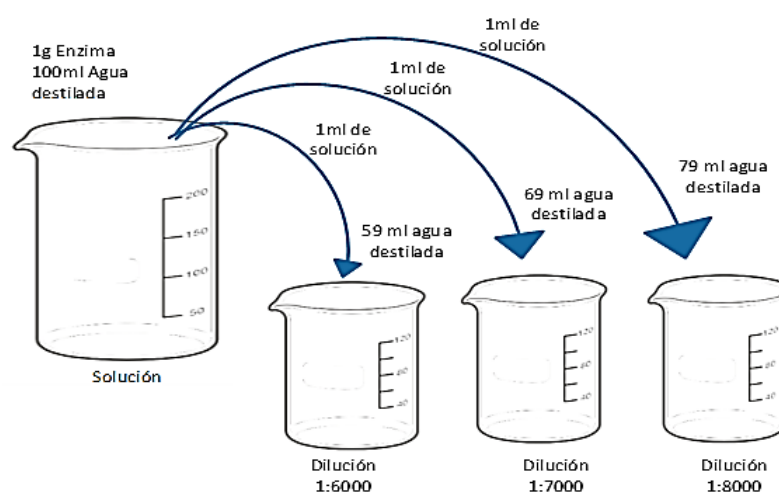


Figura 6. Esquema de las diluciones de una enzima

D. Preparación de Tampón citrato-fosfato

❖ Tampón citrato-fosfato a pH 7.0

- Se pesó 4.8025g de ácido cítrico y se diluyó en 1000 mL.
- Se pesó 8.9625g de fosfato de sodio dibásico y se diluyó en 1000 mL.
- Se extrajo 65 mL de ácido cítrico y 435 mL de fosfato de sodio dibásico y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

❖ Tampón citrato-fosfato a pH 6.0

- Se pesó 4.8025g de ácido cítrico y se diluyó en 1000 mL.
- Se pesó 8.9625g de fosfato de sodio dibásico y se diluyó en 1000 mL.
- Se extrajo 179 mL de ácido cítrico y 321 mL de fosfato de sodio dibásico y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

E. Hidrolisis enzimática

Para llevar a cabo la hidrolisis enzimática se utilizó un minireactor con capacidad de 500 mL.

- Se agregó 40 mL de buffer y 50 mL de emulsión (con una concentración de sustrato de $114.5 \frac{\text{g de aceite de oliva extra virgen}}{\text{L del volumen total}}$) en el minireactor, teniendo una agitación constante de 160 RPM.
- Luego, se dejó acondicionar el medio por 5 minutos a una temperatura ideal para cada enzima lipolítica.
- Se midió la temperatura con la ayuda de un termómetro digital hasta llegar a la temperatura deseada.
- Posteriormente se agregó 10 mL de enzima diluida (1:8000, 1:7000 y 1:6000).

- Se extrajo 10 mL de muestra del volumen total cada 5 minutos durante un periodo de reacción de 30 minutos.
- Se detuvo la reacción de cada muestra llevándolo a una temperatura de 100°C por aproximadamente un minuto y medio.
- Inmediatamente se enfrió en agua helada alrededor de un minuto y medio.
- Al finalizar, se tituló cada muestra con NaOH al 0.05N, para hallar la cantidad generada de ácidos grasos carboxílicos libres.

F. Actividad enzimática

Para la actividad enzimática se hizo uso de las siguientes ecuaciones (7) y (8):

$$\frac{\mu\text{mol. ácido graso}}{\text{mL}} = \frac{\text{gasto muestra} - \text{gasto blanco (mL)}}{\text{Volumen de muestra}} \times N \times 1000 \quad (7)$$

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{PENDIENTE} \left(\frac{\mu\text{mol. ácido graso}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right)}{\text{Volumen de muestra} \times \text{Dilución}} \times 1000 \quad (8)$$

Dónde:

Pendiente: Tendencia lineal en las diluciones 1:6000, 1:7000 y 1:8000.

Volumen de enzima diluida en la muestra total: 1mL enzima/10mL muestra

Dilución: 1:6000, 1:7000 y 1:8000.

Siendo UI la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de ácidos grasos libres por minuto.

3.3.3 Determinación de los parámetros cinéticos

Según (Bas & Boyaci, 2007) la cinética enzimática se explica mediante la ecuación no lineal, la cual cumple con la cinética de Michaelis-Menten.

Determinándose así la velocidad de reacción con la siguiente ecuación (9):

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Donde:

V es la velocidad de reacción.

[S] es la concentración de sustrato.

K_m constante de Michaelis-Menten.

V_{máx} es la velocidad de reacción límite.

La curva de regresión lineal precisada por Lineweaver y Burk expresada mediante la ecuación (10), puede determinar los parámetros cinéticos (K_m y V_{máx}). Esta ecuación es la forma linealizada de la ecuación de Michaelis-Menten. Donde la acción Gráfico del inverso de la velocidad (1/V) y del sustrato (1/[S]) es conocida como la gráfica de Lineweaver y Burk.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (10)$$

Según (Bas & Boyaci, 2007), la gráfica de Lineweaver y Burk tiene una mejor linealidad, cuando la concentración de sustrato se encuentra en el rango de 0,25 - 5 K_m.

Por consiguiente, la metodología experimental empleada para hallar los parámetros cinéticos de las lipasas fueron las siguientes:

a. Lipasa “AY AMANO 30 SD”

1. Se utilizó como sustrato el aceite de oliva extra virgen para la emulsión en los intervalos de concentración de 0.6412g/L -12.824 g/L, para la reacción se utilizó una dilución enzimática 1:7000 de la lipasa.
2. Se preparó la emulsión 1:1, solución PVA al 2% y aceite de oliva extra virgen.
3. Se realizaron 6 experiencias usando una concentración diferente de sustrato en los intervalos de concentración mencionada (0.6412g/L - 12.824 g/L de aceite)

Cuadro 5: *Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos ‘Km’ y ‘Vmáx’ de la Lipasa “AY AMANO 30 SD”*

N° Experiencias	Concentración [So] g/L	Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Enzima (mL)
1	0.6412	0.0350	22.4650	2.500
2	2.8946	0.1580	22.3420	2.500
3	5.1296	0.2800	22.2200	2.500
4	7.6944	0.4200	22.0800	2.500
5	9.7096	0.5300	21.9700	2.500
6	12.8240	0.7000	21.8000	2.500

b. Lipasa “A AMANO 12”

1. Se utilizó como sustrato el aceite de oliva extra virgen para la emulsión en los intervalos de concentración de 2.5648 g/L – 47.632 g/L, para la reacción se utilizó una dilución enzimática 1:6000 de la lipasa.
2. Se preparó la emulsión 1:1, solución PVA al 2% y aceite de oliva extra virgen.
3. Se realizaron 6 experiencias usando una concentración diferente de sustrato en los intervalos de concentración mencionada (2.5648 g/L – 47.632 g/L de aceite)

Cuadro 6: *Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos ‘Km’ y ‘Vmáx’ de la Lipasa “A AMANO 12”*

N° Experiencias	Concentración [So] g/L	Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Enzima (mL)
1	2.5648	0.1400	22.3600	2.500
2	3.6640	0.2000	22.3000	2.500
3	5.4960	0.3000	22.2000	2.500
4	10.9920	0.6000	21.9000	2.500
5	18.3200	1.0000	21.5000	2.500
6	47.6320	2.6000	19.9000	2.500

c. Lipasa “DF AMANO 15”

1. Se utilizó como sustrato el aceite de oliva extra virgen para la emulsión en los intervalos de concentración de 1.7587 g/L – 33.4523 g/L, para la reacción se utilizó una dilución enzimática 1:7000 de la lipasa.
2. Se preparó la emulsión 1:1, solución PVA al 2% y aceite de oliva extra virgen.
3. Se realizaron 6 experiencias usando una concentración diferente de sustrato en los intervalos de concentración mencionada (1.7587 g/L – 33.4523 g/L de aceite).

Cuadro 7: *Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos ‘Km’ y ‘Vmáx’ de la Lipasa “DF AMANO 15”*

N° Experiencias	Concentración [So] g/L	Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Enzima (mL)
1	1.7587	0.0960	22.4040	2.500
2	2.7846	0.1520	22.3480	2.500
3	5.1296	0.2800	22.2200	2.500
4	10.9920	0.6000	21.9000	2.500
5	23.8160	1.3000	21.2000	2.500
6	33.4523	1.8260	20.6740	2.500

3.3.4 Hidrólisis enzimática

Se recepcionó el aceite semi-refinado de anchoveta previamente caracterizado y el agua destilada (exenta de iones metálicos pesados que puedan inhibir la enzima), la relación de dilución agua – sustrato fue de 1:1 colocadas en un matraz de 150 mL. Todas estas muestras se colocaron en un shaker con agitación fija de 160 RPM a las diferentes condiciones de Temperatura (°C), Concentración de enzima (U/mL) y Tiempo de reacción (Horas) del diseño experimental como se indica en el Cuadro 8.

Pasado el tiempo de reacción, se retiró la muestra hidrolizada y se procedió a inactivarse; luego se añadió en tubos de ensayo de 10 mL para ser centrifugado en condiciones de 4000 RPM por un tiempo de 15 minutos. Una vez centrifugada la muestra, se separará el aceite hidrolizado del agua.

Finalmente, se determinó el grado de hidrólisis mediante el análisis titrimétrico señalado por Camacho (2014) mediante la siguiente ecuación (11):

$$\%GH = \frac{Acidez\ aceite\ hidrolizado - Acidez\ aceite\ inicial}{Índice\ de\ Saponificación\ inicial - Acidez\ aceite\ inicial} \times 100 \quad (11)$$

El primer diseño de Taguchi se realizó con la finalidad de evaluar el factor categórico (tipo de enzima) y así determinar cuál era la o las enzimas con mejores resultados, se contó con 4 factores (3 continuos y 1 categórica) como se observa en el Cuadro 9.

El segundo diseño de Box-Behnken mostrado en el Cuadro 10, se realizó con la finalidad de estudiar el efecto de los tres (3) factores continuos de la mejor enzima obtenida y el % GH.

Cuadro 8: *Diseño estadístico experimental*

VARIABLES INDEPENDIENTES	NIVELES		
	-1	0	1
Tipo de lipasa	Lipasa AY AMANO 30SD	Lipasa A AMANO 12	Lipasa DF AMANO 15
Concentración de lipasa (U/mL)	150	300	450
Tiempo (Horas)	12	30	48
Temperatura (°C)	40	50	53

Cuadro 9: *Diseño experimental de Taguchi*

VARIABLE INDEPENDIENTE								
Muestra	CODIFICADO				REAL			
	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	Tipo de enzima	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	Tipo de enzima
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1	150	40	12	Lipasa AY AMANO 30SD
2	-1	0	0	0	150	50	30	Lipasa DF AMANO 15
3	-1	1	1	1	150	53	48	Lipasa A AMANO 12
4	0	-1	0	1	300	40	30	Lipasa A AMANO 12
5	0	0	1	-1	300	50	48	Lipasa AY AMANO 30SD
6	0	1	-1	0	300	53	12	Lipasa DF AMANO 15
7	1	-1	1	0	450	40	48	Lipasa DF AMANO 15
8	1	0	-1	1	450	50	12	Lipasa A AMANO 12
9	1	1	0	-1	450	53	30	Lipasa AY AMANO 30SD

Cuadro 10: *Diseño experimental de Box-Behnken*

Tipo de enzima: Lipasa DF AMANO 15						
Muestra	CODIFICADO			REAL		
	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)
1	1	0	-1	450	40	12
2	0	-1	1	300	35	48
3	0	0	0	300	40	30
4	-1	-1	0	150	35	30
5	0	1	1	300	45	48
6	0	-1	-1	300	35	12
7	1	1	0	450	45	30
8	-1	0	1	150	40	48
9	1	-1	0	450	35	30
10	0	0	0	300	40	30
11	-1	1	0	150	45	30
12	0	0	0	300	40	30
13	0	1	-1	300	45	12
14	1	0	1	450	40	48
15	-1	0	-1	150	40	12

3.3.5.1.Procedimiento experimental

En la siguiente Figura 7 se observa las etapas del proceso experimental de la hidrolisis enzimática para la obtención del aceite semirefinado de anchoveta concentrado.

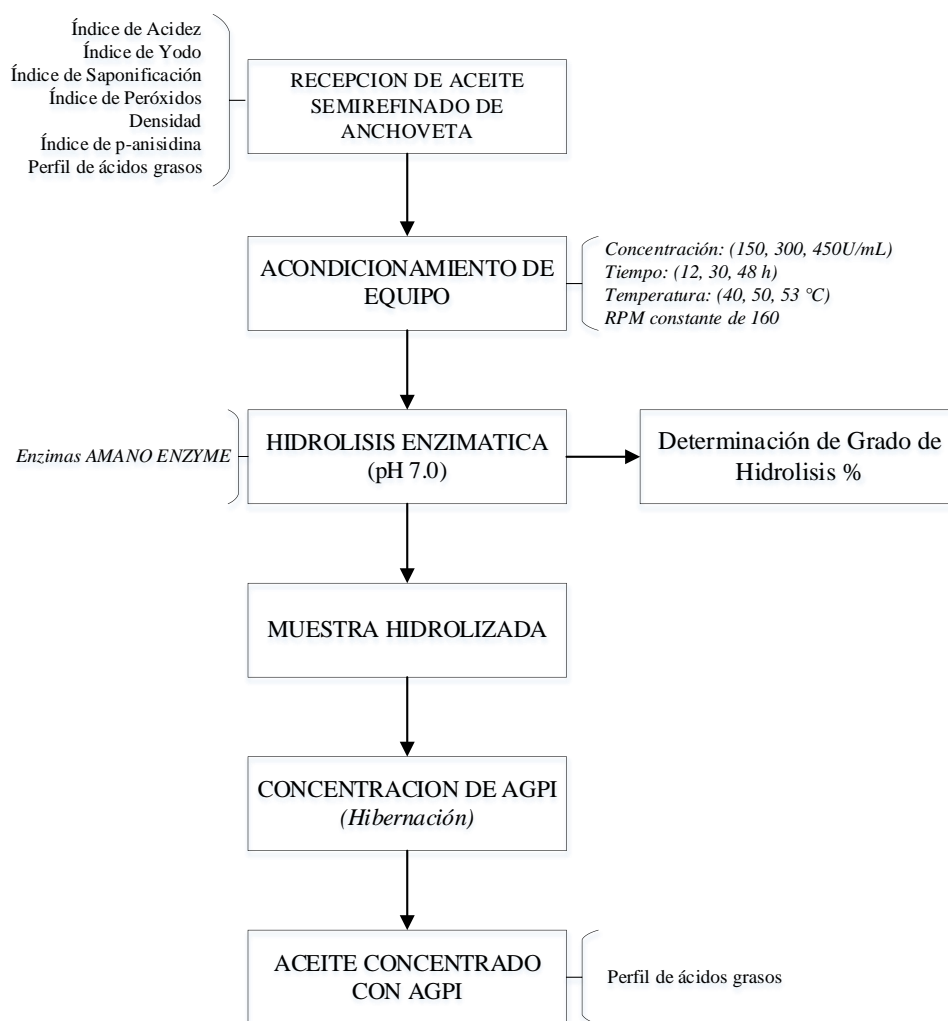


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso experimental para la obtención del aceite semirefinado de anchoveta concentrado

3.3.5 Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados

Según Bernandini (1986) se inicia la fase de enfriamiento de 25°C a 5°C en el transcurso de una hora que en este caso fue sometida la muestra de aceite hidrolizada. Luego de ello se aumentó la velocidad de cristalización con ayuda de un solvente orgánico llevándolo a una temperatura de -5°C en aproximadamente cuatro horas. Posteriormente, se conservó a una temperatura constante de -5°C por un periodo de tiempo de cuatro horas. Finalizado el proceso de concentración de ácidos grasos, se filtró la muestra hibernada utilizando una jeringa previamente esterilizada y algodón.

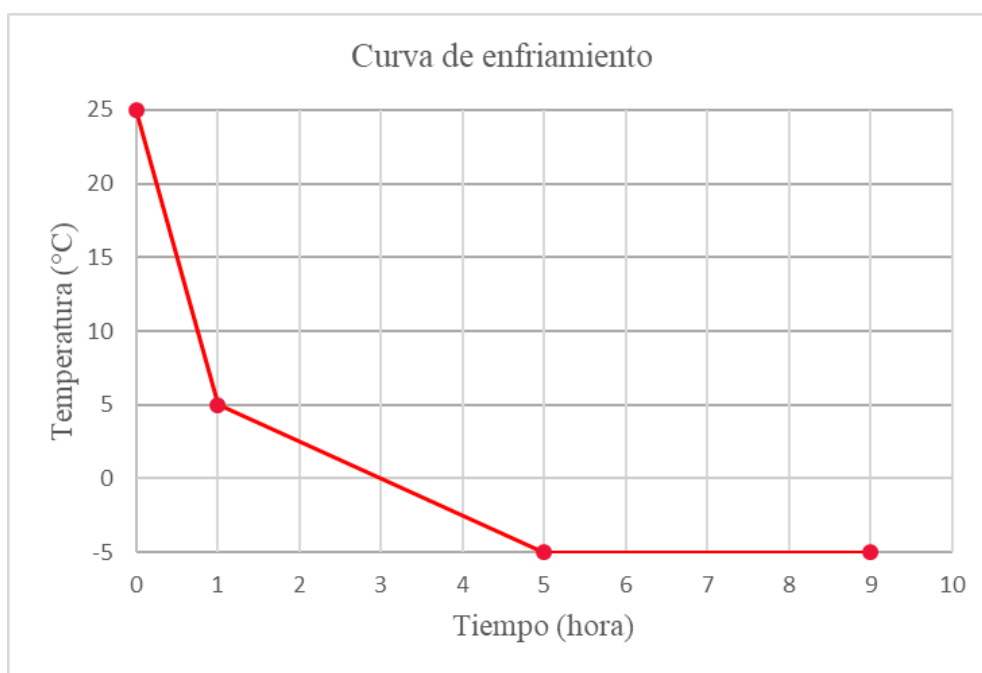


Figura 8. *Curva de enfriamiento para la concentración de AGPI.*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta

La caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta se precisa en el siguiente cuadro.

Cuadro 11: *Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta*

Análisis	Media \pm Desviación estándar
Índice de acidez (%)	0.49 ± 0.007
Índice de saponificación (mg de KOH/g)	186.76 ± 0.21
Índice de peróxidos (meq O ₂ /Kg)	4.56 ± 0.395
Índice de anisidina	6.80 ± 0.23
Índice de yodo (mg I ₂ /g)	175.87 ± 0.350
Densidad (g/mL)	0.923 ± 0.003

Respecto a los criterios de calidad en cuanto al índice de acidez se obtuvo 0.974 ± 0.013 mg de KOH necesaria para neutralizar la acidez libre en 1 gramo de grasa, siendo este un $0.49 \pm 0.007\%$ de acidez. En cuanto a otros autores como Alonso y Chuqui (2019), reportan un índice de acidez de $0.43 \pm 0.01\%$, asimismo Encinas (2021) reporta un índice de acidez de $0.13 \pm 0.020\%$; en comparación con los resultados obtenidos este tuvo un mayor porcentaje de acidez. Sin embargo, según la NTP 312.004:1980 la acidez debe ser de 0.50%, y según el CXS 329-2017 el índice de acidez debe ser ≤ 3 mg KOH/g encontrándose dentro de lo establecido.

En cuanto al índice de saponificación se obtuvo 186.76 ± 0.21 mg de KOH requeridos para saponificar los ácidos grasos libres presentes en 1 gramo de grasa, según Pinto (2013) este valor se encuentra dentro de lo establecido por la NTP 312.004:1980 donde el valor debe estar entre 186 - 198 mg KOH/g.

Con relación al índice de peróxidos se obtuvo 4.56 ± 0.395 meqO₂/kg. Alonso y Chuqui (2019), en su investigación reportó un índice de peróxidos de 4.89 ± 0.040 meqO₂/kg, comparando con este se obtuvo un menor estado de rancidez oxidativa. Según el CXS 329-2017 el índice de peróxidos debe ser ≤ 5 meqO₂/kg, encontrándose dentro de lo establecido.

El índice de anisidina se obtuvo 6.804 ± 0.230 . Otros autores como Alonso y Chuqui (2019) y Encinas (2021), reportan un índice de p-anisidina de 15.26 ± 0.550 y 11.29 ± 0.318 respectivamente; obteniendo un menor valor en comparación a estos autores. Según el CXS 329-2017 el índice de p-anisidina debe ser ≤ 20 , encontrándose dentro de lo establecido.

El índice de yodo tuvo un valor de 175.87 ± 0.350 mg I₂/g de aceite. Alonso y Chuqui (2019), reportan un índice de yodo de 178.12 ± 1.120 mg I₂/g de aceite, asimismo Encinas (2021) reportó un índice de 187.15 ± 0.569 mg I₂/g de aceite, en comparación el índice obtenido en esta investigación es menor al de los mencionados. Según la NTP 312.004:1980 el índice de yodo debe estar entre 175-196 mg I₂/g de aceite, encontrándose dentro del rango establecido.

Referente a la densidad se obtuvo un valor de 0.923 ± 0.003 g/mL, según Pinto (2013) este valor se encuentra dentro de lo establecido por la NTP 312.004:1980 donde el valor debe estar entre 0.92 - 0.93 g/mL.

Por lo que concierne a la composición de ácidos grasos en el aceite semirefinado de anchoveta, se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 12: *Composición de ácidos grasos del aceite semirefinado de anchoveta*

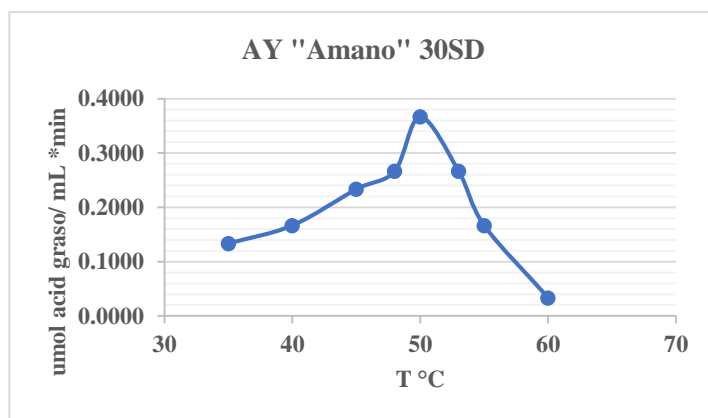
Nomenclatura	Nombre común	%
C14:0	Ácido Mirístico	8.62
C16:0	Ácido Palmítico	19.43
C18:0	Ácido Estearico	3.45
C20:0	Ácido Araquídico	0
C22:0	Ácido Behénico	0
C23:0	Ácido Tricosanoico	0
C24:0	Ácido Tetracosanoico	0
Total AGS		31.49
C24:1	Ácido Nervónico	0
C22:1	Ácido Erúcido	0
C20:1	Ácido Gadoleico	0
C18:1 VAC	Ácido Vaccénico	0
C18:1 OLE	Ácido Oleico	15.02
C16:1	Ácido Palmitoleico	7.68
C14:1	Ácido Mirístoleico	0
Total AGM		22.70
C20:4 (n-6)	Ácido Araquidónico	0
C20:2 (n-6)	Ácido Eicosadenoico	0
C18:2 (n-6)	Ácido Linoleico	4.46
Total AGPI n-6		4.46
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- γ -linolénico	0
C18:3 (n-3)	Ácido γ -linolénico	3.04
C20:5 (n-3)	Ácido Eicosapentaenoico - EPA	21.66
C22:6 (n-3)	Ácido Docosahexaenoico - DHA	16.64
Total AGPI n-3		41.34

A nivel mundial la anchoveta es una de las especies con mayor contenido de ω -3 y valorado por su contenido de EPA y DHA, saber sobre la composición de estos en la industria es requisito ya que son parámetros indispensables a la hora de comercializar. Los siguientes autores reportan en su investigación el contenido de EPA y DHA del aceite semirefinado de anchoveta los cuales fueron: 34.7% (Cert, 2017), 28.5% (Esquivel *et al.*, 2017), 29.1 a 33.1% (Salas *et al.*, 2003), 23.65% (Cedr s *et al.*, 2013), 26.14% (Robalino, 2009) comparando estos con los datos obtenidos 38.30% de EPA y DHA este se encuentra ligeramente por encima de los rangos encontrados en la literatura. Cabe señalar que la composición de ácidos grasos se ven influenciados ya sea por el área de captura, dieta, edad, madurez sexual y estación, por lo tanto, estos datos pueden llegar a variar (Encinas, 2021). Es por ello que se realizó el perfil de ácidos grasos ya que es fundamental en esta investigación.

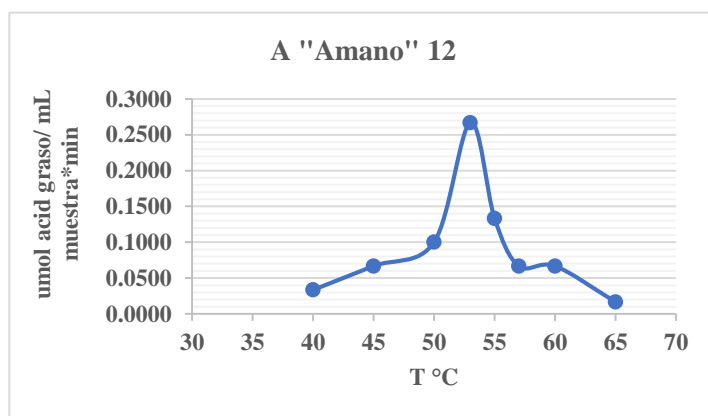
4.2 Determinación del rango de linealidad y actividad enzimática de las lipasas

4.2.1 Efecto de la temperatura

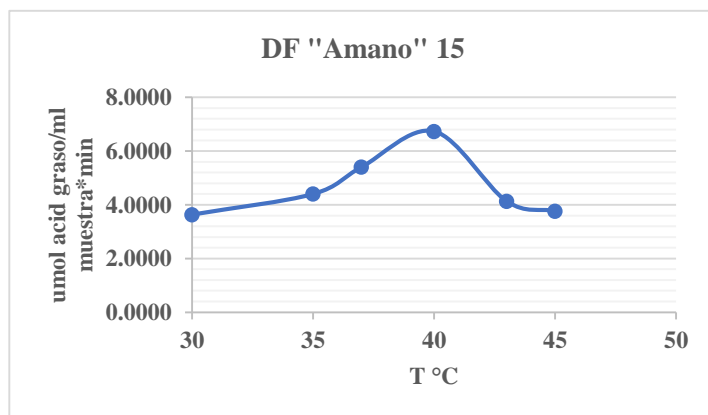
Para determinar el rango de linealidad fue necesario realizar el efecto de la temperatura para cada lipasa. A continuación, el análisis de este efecto:



(A)



(B)



(C)

Figura 9. Efecto de la temperatura en las lipasas

En la figura 9(A) muestra que la lipasa AY “Amano” 30SD a medida que se incrementa la temperatura llega a un punto máximo en su actividad de 50°C. En la figura 9(B) muestra a la lipasa A “Amano” 12 incrementarse hasta llegar a los 53°C donde obtiene su máxima actividad y por último en la figura 9(C) la mayor actividad llega a una temperatura de 40°C; una vez llegado al punto máximo estas disminuyen.

El resultado obtenido para la lipasa AY “Amano” 30SD (*Candida cylindracea*), A “Amano” 12 (*Aspergillus niger*) y DF “Amano” 15 (*Rhizopus oryzae*) fue una T° óptima de 50, 53 y 40°C, respectivamente; validando lo especificado en la ficha técnica. Según autores reportan que la temperatura óptima de la lipasa de origen *Candida cylindracea* es de 50°C (Encinas, 2021) y 45°C (Gentili *et al.*, 1996); la lipasa de origen *Aspergillus niger* es de 50°C (Mayel *et al.*, 2020) y 55°C (De Souza *et al.*, 2020); y la lipasa de origen *Rhizopus oryzae* es de 55°C (Ayinla *et al.*, 2021) y 35°C (Bhandari *et al.*, 2013); en comparación con los resultados obtenidos este no fue el mismo, esto se debe a que en la literatura las lipasas son de distinto proveedor, se utiliza diferentes métodos y condiciones de aplicación para determinar la actividad.

Teniendo en cuenta que las lipasas son de origen fúngico; Carvalho *et al.*, (2009) menciona que si la temperatura de reacción es mayor a 45°C causará la desnaturalización de algunas enzimas con este origen. Por lo tanto, se comprueba en el efecto de las temperaturas que dos de las lipasas pertenecientes a este origen como *Candida cylindracea* (AY “Amano” 30SD) y *Aspergillus niger* (A “Amano” 12) obtienen su actividad máxima a temperatura mayor a 45°C; mientras que la *Rhizopus oryzae* (DF “Amano” 15) obtiene una actividad máxima a baja

temperatura, según Dobrev *et al.*, (2011) mencionan que la aplicación de lipasas en la industria deben realizarse a bajas temperaturas ya que favorece no solo las condiciones de calidad con el sustrato, sino también al ahorro de energía.

4.2.2 Rango de linealidad de las lipasas

Para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa AY “Amano” 30SD se tuvo en cuenta 3 diluciones 1:6000, 1:7000, 1:8000, realizándose el rango de linealidad en el tiempo de 20 y 15 minutos (Figura 10, 11 y 12), teniendo como resultado $37\,200 \pm 151.132$ U/mL, $37\,100 \pm 148.372$ U/mL y $35\,200 \pm 135.337$ U/mL respectivamente (ver Cuadro 30) trabajaron con un sustrato de emulsión de aceite de oliva a una concentración de 114.5 g/L y bajo las mismas condiciones de reacción pH 7 y agitación 160 RPM. Según el certificado de análisis de esta enzima proporcionada por el proveedor la actividad debe encontrarse entre 30 000 U/mL y 36 100 U/mL, en los resultados obtenidos se muestra un promedio de 36500 ± 144.947 U/mL lo cual indica que se encuentra dentro del rango indicado en la ficha técnica.

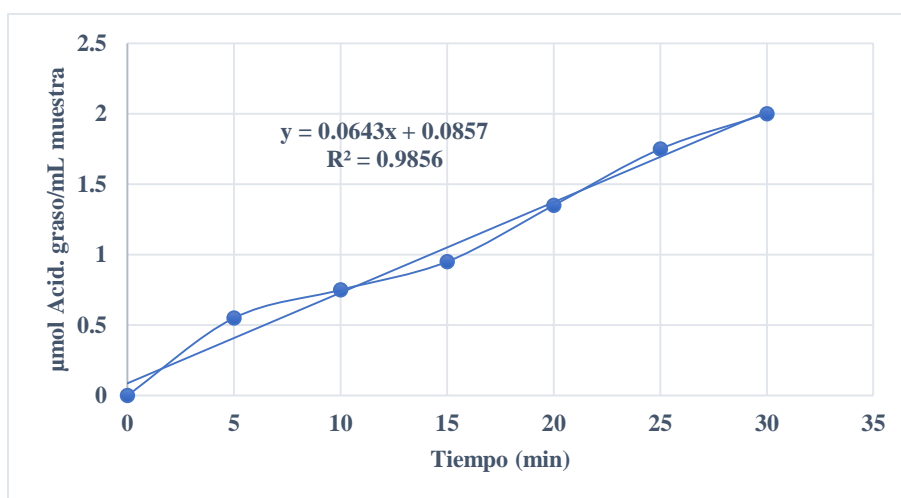


Figura 10. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano” 30SD a dilución 1:6000

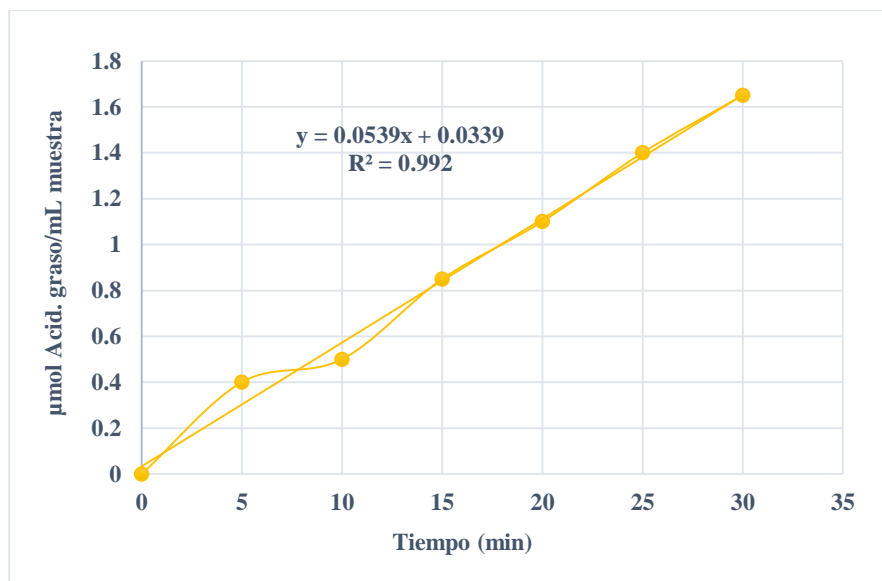


Figura 11. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano”

30SD a dilución 1:7000

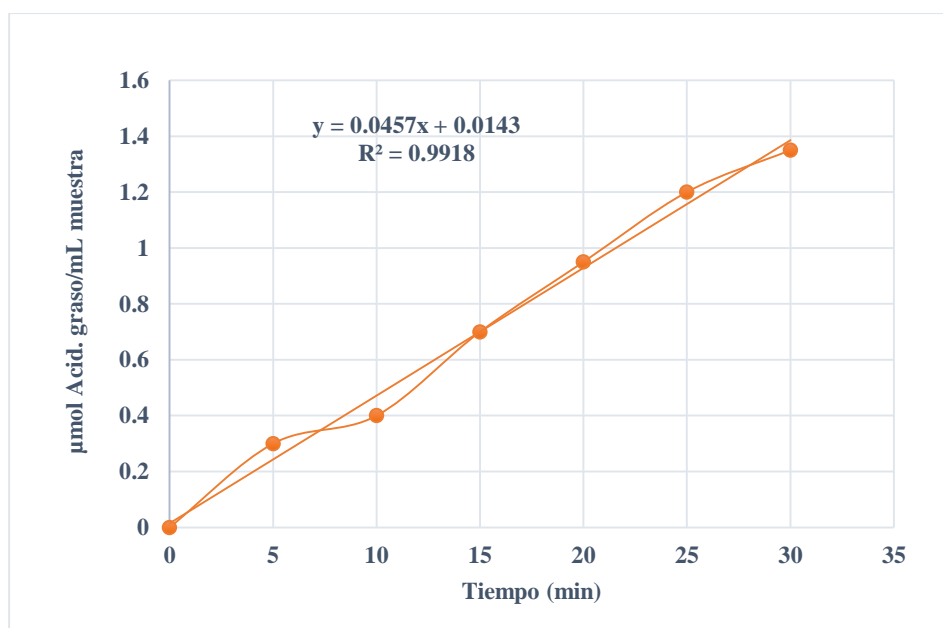


Figura 12. Determinación del rango de linealidad de la lipasa AY “Amano”

30SD a dilución 1:8000

Para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa A “Amano” 12 se tuvo en cuenta 3 diluciones 1:6000, 1:7000, 1:8000, realizándose el rango de linealidad en el tiempo de 15 minutos (Figura 13, 14 y 15), teniendo como resultado $121\,200 \pm 205.149$ U/mL, $121\,100 \pm 267.541$ U/mL y $120\,000 \pm 199.862$ U/mL respectivamente (ver Cuadro 31) trabajaron con un sustrato de emulsión de aceite de oliva a una concentración de 114.5 g/L y bajo las mismas condiciones de reacción pH 6 y agitación 160 RPM. Según el certificado de análisis de esta enzima proporcionada por el proveedor la actividad debe encontrarse entre 120000 U/mL y 139 000 U/mL, en los resultados obtenidos se muestra un promedio de $120\,766.7 \pm 224.184$ U/mL lo cual indica que se encuentra dentro del rango indicado en la ficha técnica.

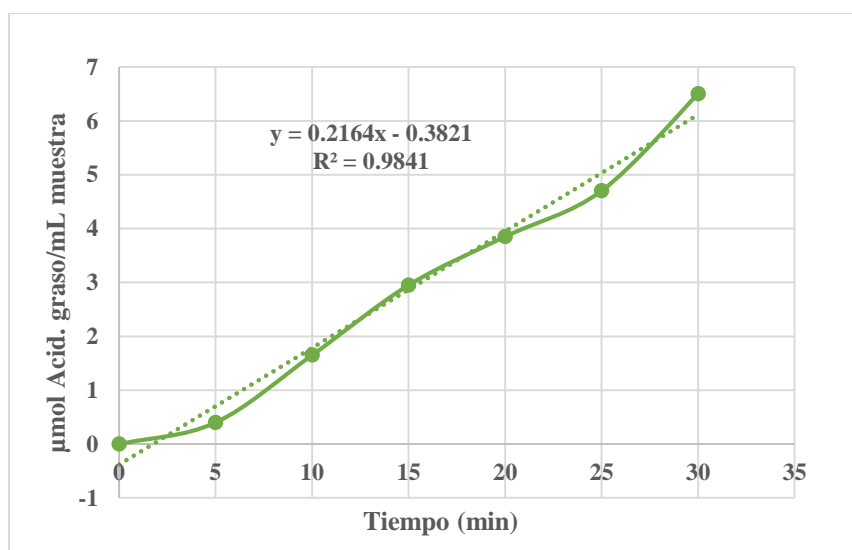


Figura 13. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:6000*

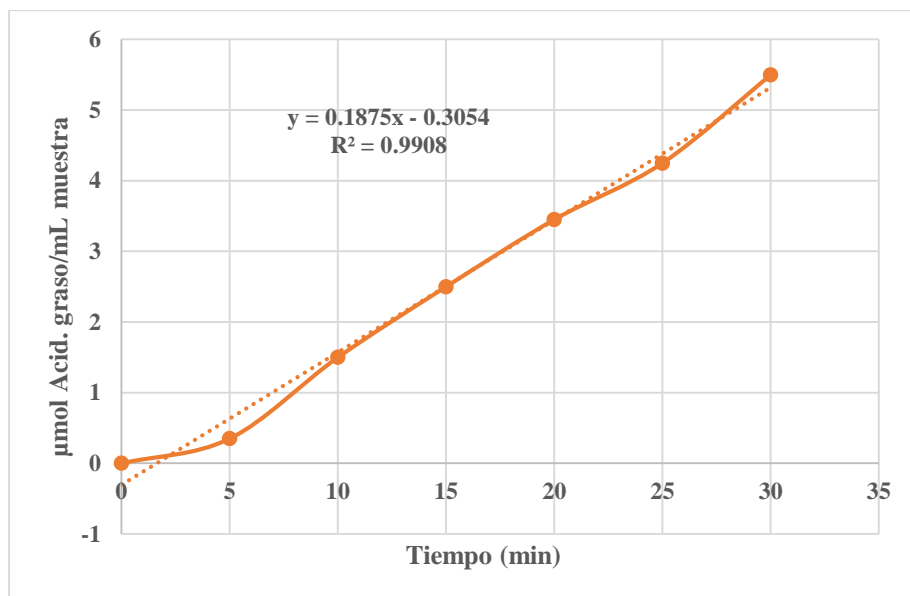


Figura 14. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:7000*

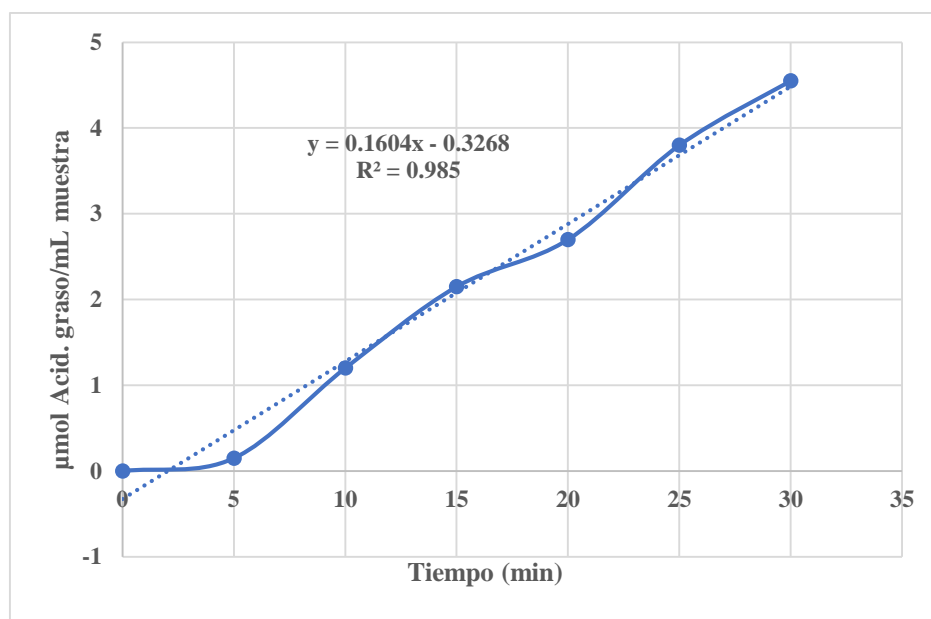


Figura 15. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa A “Amano” 12 a dilución 1:8000*

Para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa DF “Amano” 15 se tuvo en cuenta 3 diluciones 1:6000, 1:7000, 1:8000, realizándose el rango de linealidad en el tiempo de 25 y 15 minutos (Figura 16, 17 y 18), teniendo como resultado $179\,820 \pm 138.164$ U/mL, $179\,900 \pm 154.829$ U/mL y $176\,000 \pm 139.945$ U/mL respectivamente (ver Cuadro 32) trabajaron con un sustrato de emulsión de aceite de oliva a una concentración de 114.5 g/L y bajo las mismas condiciones de reacción pH 7 y agitación 160 RPM. Según el certificado de análisis de esta enzima proporcionada por el proveedor la actividad debe encontrarse entre 150000 U/mL y 179 000 U/mL, en los resultados obtenidos se muestra un promedio de $178\,573.3 \pm 144.313$ U/mL lo cual indica que se encuentra dentro del rango indicado en la ficha técnica.

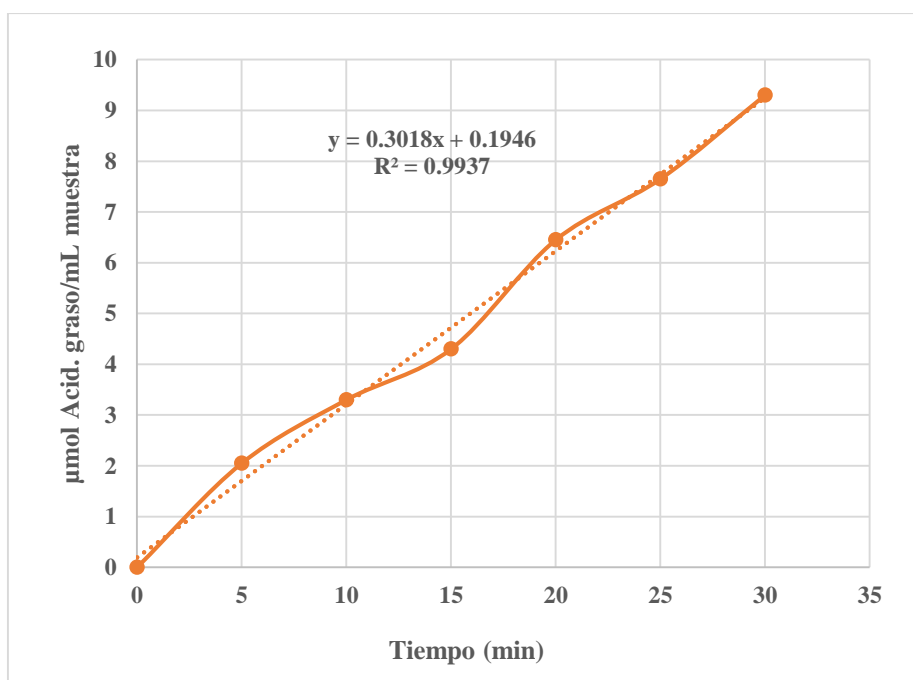


Figura 16. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15 a dilución 1:6000*

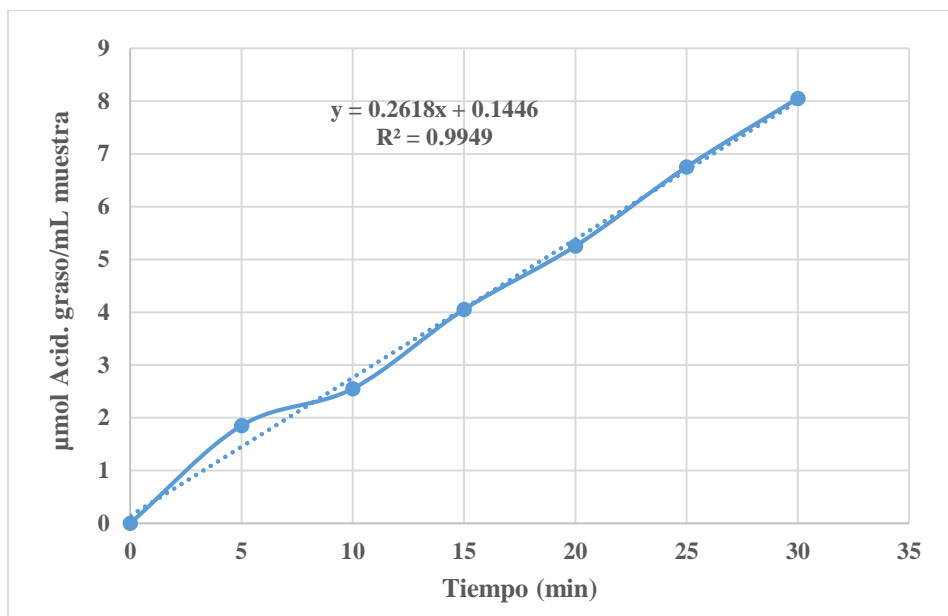


Figura 17. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15
a dilución 1:7000*

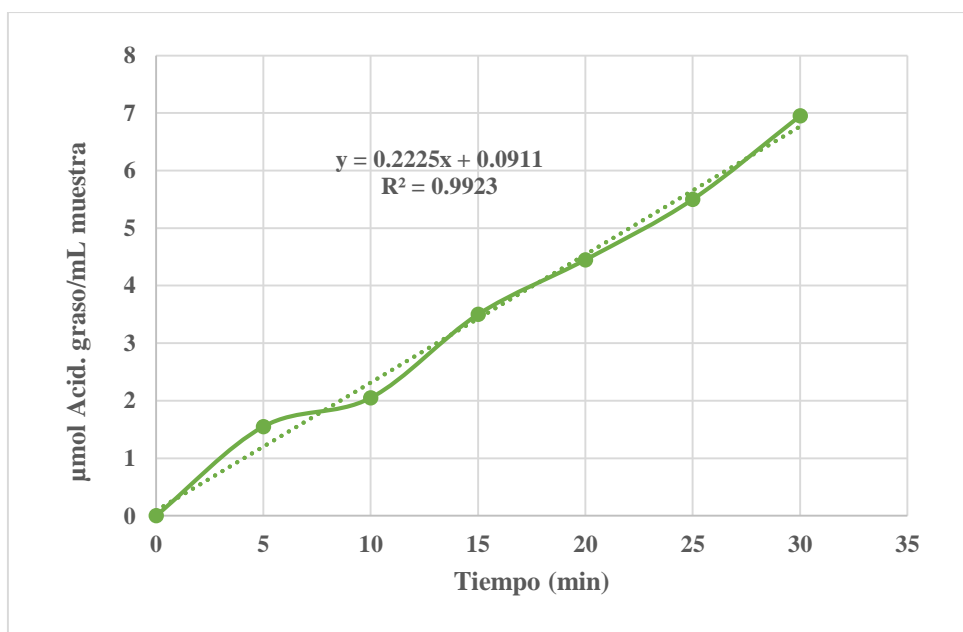


Figura 18. *Determinación del rango de linealidad de la lipasa DF “Amano” 15
a dilución 1:8000*

Se muestran desde la figura 10 hasta la figura 18, las curvas del rango de linealidad producidas en las diferentes concentraciones por cada tipo de lipasa, mostrando la cantidad de μmol de ácido grasos/mL de muestra producida en función al tiempo. Para las tres enzimas en mención fueron contrastadas con otras investigaciones realizadas a lo largo de los últimos años donde para la *Candida cylindracea* según López *et al.*, (2000), obtienen una actividad de 26 000 y 49 000 U/mL usando como sustratos triacetina y p-nitrofenol butirato, respectivamente; en cuanto Encinas (2021) utilizó aceite de oliva como sustrato y logró obtener una actividad de 37 384.55 U/mL similar a la de nuestro estudio; por otro lado, la *Aspergillus niger*, Armas *et al.*, (s.f.), mencionan una actividad de 1.47 U/mL haciendo uso de la mezcla de sacarosa y aceite de oliva como sustrato; y finalmente la *Rhizopus oryzae* según Guillen (2012) reporta una actividad de 270.5 y 264.5 U/mL usando como sustrato p-nitrofenol. Como bien se mencionó anteriormente existen factores que alteran la actividad lipídica como son los diferentes sustratos, condiciones y métodos empleados para medir esta actividad.

4.3 Caracterización cinéticamente las lipasas mediante la determinación de los parámetros cinéticos.

El resultado obtenido de los parámetros cinéticos (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) para los tres tipos enzimas se realizó gráficamente aplicando la curva de regresión lineal de Lineweaver y Burk (1934); teniendo como ecuación la siguiente:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

4.3.1 Parámetro cinético de la lipasa AY “Amano” 30SD

Cuadro 13: *Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa AY “Amano” 30SD*

N°	So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
1	0.6412	0.000005763	1.5596	173522.852
2	2.5648	0.000005767	0.3899	173398.945
3	3.2976	0.000005773	0.3033	173225.4753
4	5.1296	0.000005779	0.1949	173044.9251
5	7.6944	0.000005788	0.1300	172761.7092
6	9.7096	0.000005799	0.1030	172443.0913
7	12.8240	0.000005812	0.0780	172053.6694

En cuanto a la concentración de sustrato utilizado; según Bas & Boyaci (2007) menciona que el rango de los gráficos de Lineweaver-Burk funciona mejor cuando la concentración de sustrato cubre el rango de 0.25 - 5 K_m , debido a que dentro de este rango se observa una buena linealidad. Con esta información se reemplazó en la fórmula $V = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_m + [S]}$ y se consideró un K_m teórico; según Sharman *et al.*, (2013) el valor de K_m en esa investigación fue de (2.569 g/L). Al reemplazar se obtuvo un rango de concentración de sustrato entre (0.6425g/L - 12.85 g/L), se

consideró estos valores y se realizó el rango de linealidad para la lipasa AY “Amano” 30SD.

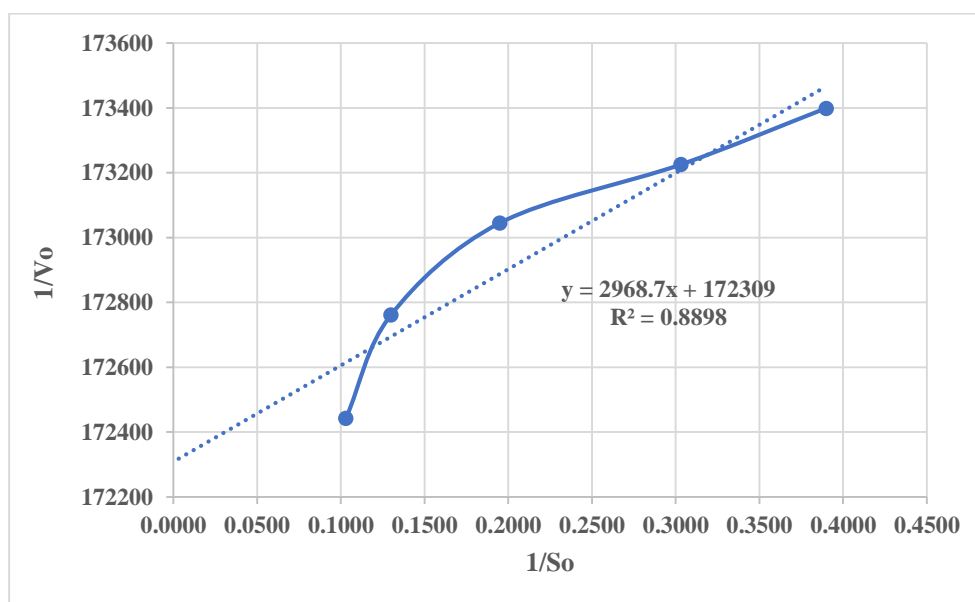


Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa AY “Amano” 30SD

$$\frac{1}{V} (y) = \frac{Km}{Vmax} (2968.7) x \frac{1}{[S]} (x) + \frac{1}{Vmax} (172309.00)$$

En cuanto a los parámetros cinéticos obtenidos de la enzima AY Amano 30SD mediante la ecuación de la gráfica de Lineweaver-Burk se obtuvo una constante de Michaelis-Menten (Km) de 0.017 g/L, velocidad máxima (V_{máx}) de 0.0057 g/L*min y un R² igual a 0.8898. Otros autores que realizaron estudios con esta enzima de origen *Candida cylindracea* obtuvieron lo siguiente; Encinas (2021) obtuvo un Km de 7.98 g/L y un V_{máx} de 0.038887 g/L*min; mientras que Sharma *et al.*, (2013) en su investigación obtuvo un Km de 2.57 g/L y un V_{máx} de 9.82 g/L*min; esto debido a que en dichas investigaciones se trabajaron con diferentes concentraciones de sustrato como tipo de sustrato en comparación a la de este estudio. Sin embargo, según López y García (2015) mencionan que un Km más bajo corresponde a una mayor afinidad por el sustrato, mientras que un Km alto

corresponde a una menor afinidad por el sustrato, por lo que se considera que el K_m obtenido en esta investigación tiene afinidad con el sustrato. En cuanto a la velocidad máxima, Urquijo *et al.*, (2020), menciona que es cuando la enzima se encuentra saturada por el sustrato, en este caso un $V_{m\acute{a}x}$ de 0.0057g/L*min.

4.3.2 Parámetro cinético de la lipasa A “Amano” 12

Cuadro 14: Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa A “Amano” 12

N°	So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
1	2.5648	0.0000039	0.3899	259275.3213
2	3.6640	0.0000039	0.2729	259142.5638
3	5.4960	0.0000039	0.1820	258797.3944
4	7.3280	0.0000039	0.1365	258505.328
5	10.9920	0.0000039	0.0910	258213.2616
6	18.3200	0.0000039	0.0546	257682.2317
7	25.6480	0.0000039	0.0390	257204.3049
8	32.9760	0.0000039	0.0303	256859.1355
9	47.6320	0.0000039	0.0210	256221.8997

Respecto a la concentración de sustrato utilizado; según Bas & Boyaci (2007) como se mencionó anteriormente; se reemplazó en la fórmula $V = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_m + [S]}$ y se consideró un K_m teórico, según De Souza *et al.*, (2020) el valor de K_m en esa investigación fue de (9.771 g/L). Al reemplazar se obtuvo un rango de concentración de sustrato entre (2.4427 g/L – 48.855 g/L); se consideró estos valores y se realizó el rango de linealidad para la lipasa A “Amano” 12.

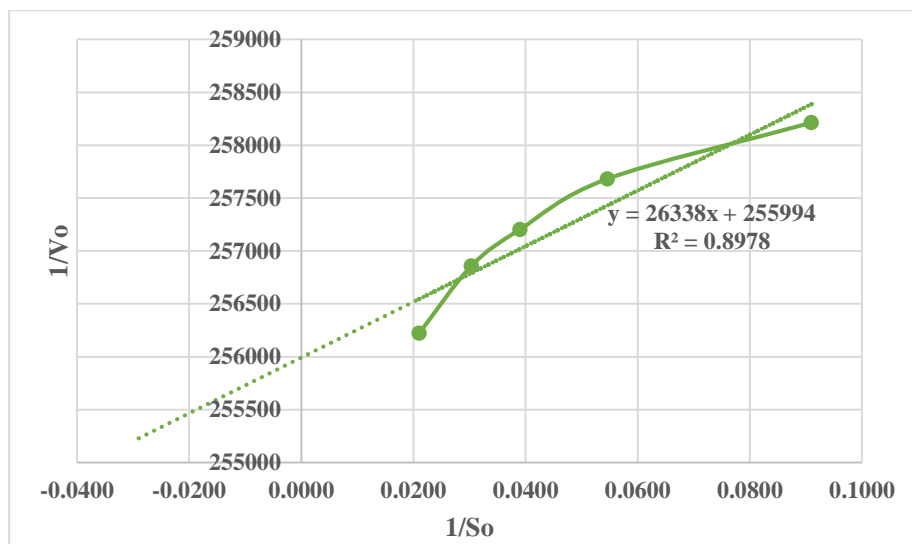


Figura 20. Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa A “Amano” 12

$$\frac{1}{V} (y) = \frac{Km}{Vmax} (26338) x \frac{1}{[S]} (x) + \frac{1}{Vmax} (255994)$$

Por lo que concierne a los parámetros cinéticos obtenidos de la enzima A Amano 12 por medio de la ecuación de la gráfica de Lineweaver-Burk se obtuvo un Km de 0.038 g/L, Vmáx de 0.0094 g/L*min y un R² igual a 0.8978. Otros autores que realizaron estudios con esta enzima de origen *Aspergillus niger* obtuvieron lo siguiente; De Souza *et al.*, (2020) obtuvieron un Km de 9.77 g/L y un Vmáx de 0.5648 g/L*min; mientras que Nakajima *et al.*, (2012) obtuvieron un Km de 1.08 g/L y un Vmáx de 0.0091 g/L*min; esto debido a que en dichas investigaciones se trabajaron con diferentes concentraciones de sustrato; sin embargo, la velocidad máxima reportado por Nakajima *et al.*, (2012) es cercana a lo reportado en este estudio. En cuanto al Km obtenido de 0.038 g/L en esta investigación tuvo afinidad con el sustrato tras lo mencionado por López y García (2015).

4.3.3 Parámetro cinético de la lipasa DF “Amano” 15

Cuadro 15: Reporte de la concentración de sustrato y la velocidad de hidrólisis en la lipasa DF “Amano” 15

N°	So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
1	1.7587	0.000004793639	0.5686	208609.7639
2	2.7846	0.000004795104	0.3591	208546.0403
3	5.1296	0.000004797059	0.1949	208461.0755
4	10.9920	0.000004799504	0.0910	208354.8695
5	15.5720	0.000004803421	0.0642	208184.94
6	23.8160	0.000004811276	0.0420	207845.0809
7	28.2128	0.000004815705	0.0354	207653.9101
8	33.4523	0.000004823600	0.0299	207314.051

Según Bas & Boyaci (2007) en relación a la concentración de sustrato utilizado, se reemplazó en la fórmula $V = \frac{V_{\text{máx}} \times [S]}{K_m + [S]}$ y consideró un K_m teórico; según Bhandari *et al.*, (2013) el valor de K_m fue de (6.664 g/L). Al reemplazar se tuvo un rango de concentración entre (1.666 g/L – 33.323 g/L); se consideró estos valores y se realizó el rango de linealidad para la lipasa DF “Amano” 15.

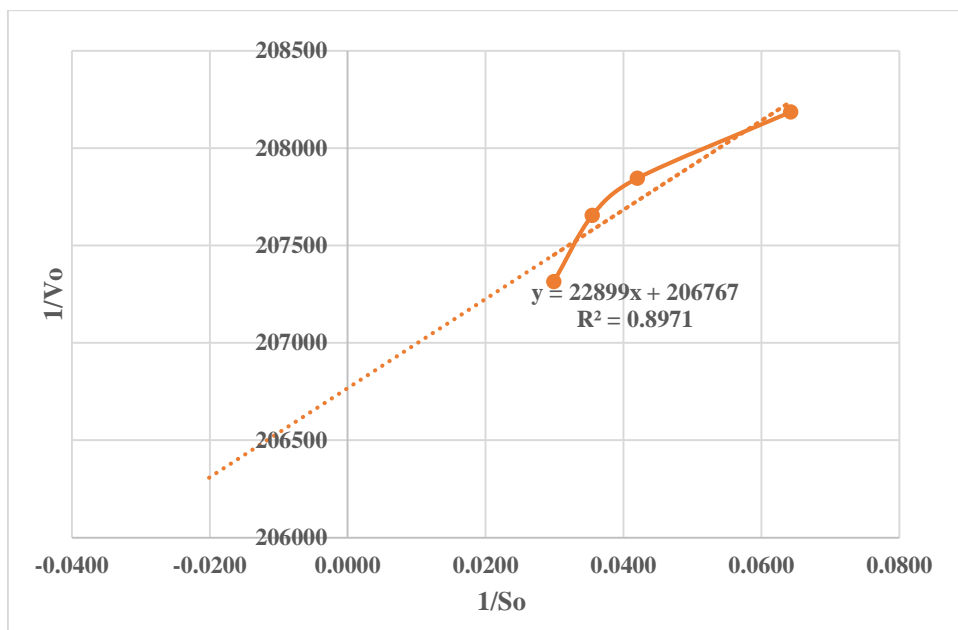


Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa “DF AMANO 15”

$$\frac{1}{V} (y) = \frac{Km}{Vmax} (22899) x \frac{1}{[S]} (x) + \frac{1}{Vmax} (206767.00)$$

Mediante la ecuación de la gráfica de Lineweaver-Burk referente a los parámetros cinéticos de la enzima DF Amano 15 se obtuvieron un Km de 0.0712 g/L, Vmáx de 0.0047 g/L*min y un R² igual a 0.8971; según López y García (2015) mencionan que un Km más bajo corresponde a una mayor afinidad por el sustrato como lo es en esta investigación. Otros autores que realizaron estudios con esta enzima de origen *Rhizopus oryzae* obtuvieron lo siguiente; Ayinla *et al.*, (2021) obtuvieron un Km de 0.054 g/L y un Vmáx de 0.036 g/L*min; mientras que Bhandari *et al.*, (2013) obtuvieron un Km de 6.66 g/L y un Vmáx de 0.056 g/L*min; en comparación el Km y Vmáx son diferentes debido a que en una de las investigaciones se utilizó como sustrato p-nitrofenilbutirato y en ambos casos se trabajaron con diferentes concentraciones de sustrato.

4.4 Determinación del grado de hidrólisis de las diferentes concentraciones de enzimas lipasas en el aceite semi-refinado de anchoveta

Para la determinación del grado de hidrólisis se contó con dos diseños experimentales mencionados en la metodología; un primer diseño experimental de Taguchi, el cual sirvió como respaldo estadístico para evaluar el factor categórico (tipo de enzima) y así se determinó cuál o cuáles fueron las enzimas más significativas. Y posterior a ello, un diseño experimental de Box-Behnken, en el que se evaluó las variables independientes continuas (concentración, temperatura y tiempo).

4.4.1 Diseño experimental de Taguchi

En el Cuadro 16 se muestra el % de grado de hidrólisis para los 9 tratamientos del diseño experimental de Taguchi donde se tuvo en cuenta los tres tipos de enzima (lipasa AY Amano 30SD, lipasa A Amano 12 y lipasa DF Amano 15).

Cuadro 16: *Resultados experimentales del % de grado de hidrólisis en los ensayos del diseño experimental de Taguchi*

Tipo de enzima	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (H)	GH (%)
L. AY Amano 30SD	150	40	12	29.31
L. DF Amano 15	150	50	30	26.81
L. A Amano 12	150	53	48	14.88
L. A Amano 12	300	40	30	14.47
L. AY Amano 30SD	300	50	48	35.94
L. DF Amano 15	300	53	12	25.63
L. DF Amano 15	450	40	48	36.52
L. A Amano 12	450	50	12	14.42
L. AY Amano 30SD	450	53	30	31.12

Cuadro 17: *Análisis de varianza para el % de grado de hidrólisis en base al tipo de enzima*

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-p
Tipo de enzima	540.42	2	270.21	17.06	0.003
Residuo	95.04	6	15.84		
Total	635.46	8			

El cuadro anova contribuye a explicar estadísticamente si la variabilidad del % de grado de hidrólisis se debe a los diferentes tipos de enzima, donde se observó que el valor-p es menor al 0.05 a un nivel de confianza del 95%, siendo este estadísticamente significativo; ya que al menos un tipo de enzima difiere entre las demás.

Cuadro 18: *Comparaciones del tipo de enzima mediante la prueba de Tukey*

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	IC de 95%	Valor-p	Error estándar de diferencia
A12 - AY30SD	-17.53	(-27.51; -7.56)	0.004	3.25
DF15 - AY30SD	-2.47	(-12.44; 7.50)	0.739	3.25
DF15 - A12	15.06	(5.09; 25.04)	0.008	3.25

En el Cuadro 18 se muestra la comparación del tipo de enzima mediante la prueba de Tukey, en el cual se determinó que la lipasa A Amano 12 con respecto a la AY Amano 30SD y DF Amano 15 obtuvieron un valor-p menor al 5% siendo este significativa y por lo tanto diferentes en comparación. Por otro lado, en la Figura 23 las lipasas DF Amano 15 y AY Amano 30SD en esta gráfica descriptiva

demuestra que son similares ya que comparten el cero y se verifica tras el valor-p estadístico mayor al 0.05 con un nivel de confianza del 95%.

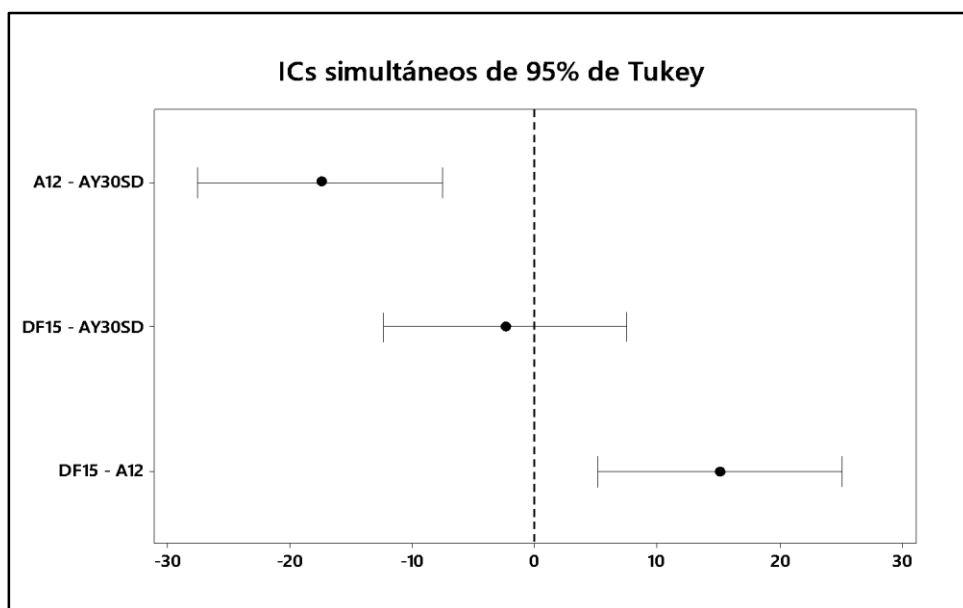


Figura 22. *Gráfica de comparación del tipo de enzima mediante la prueba de Tukey*

Conforme a lo visualizado anteriormente existen dos mejores lipasas entre ellas la lipasa AY Amano 30SD y la lipasa DF Amano 15; para este estudio se tomó en cuenta la regioespecificidad de cada una, por un lado, la lipasa AY Amano 30SD hidroliza la posición 1,2,3 de los triglicéridos; mientras que, la lipasa DF Amano 15 hidroliza la posición de 1,3 de los triglicéridos. Según Oshima (2002), los triglicéridos dependen principalmente de los ácidos grasos en los tipos de posición en que se encuentren. La posición sn-2 tiene la facilidad de ser absorbidos en el organismo y cumple un rol funcional, es ahí donde se encuentra la mayor concentración de EPA y DHA (FAO, 2012). Es así que la lipasa DF Amano 15 es la más favorable, ya que presenta una especificidad posicional sn-1,3 la cual conserva la posición sn-2. Por lo tanto, en esta investigación se tomó la lipasa DF Amano 15 para realizar el diseño de Box-Behnken.

4.4.2 Diseño experimental de Box-Behnken

En el Cuadro 19 se muestra el % de grado de hidrólisis para los 15 tratamientos del diseño experimental de Box-Behnken, teniendo como tipo de lipasa la DF Amano 15 y siendo sometida a las diferentes variables como Concentración (U/mL), Temperatura (°C) y Tiempo (H).

Cuadro 19: *Resultados experimentales del % de grado de hidrólisis con la lipasa DF Amano 15 en los ensayos del diseño experimental de Box-Behnken*

Muestra	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (H)	Grado de Hidrólisis (%)
1	450	50	12	27.56
2	300	40	48	35.61
3	150	40	30	35.47
4	300	53	48	26.10
5	300	40	12	30.95
6	450	53	30	25.76
7	150	50	48	25.57
8	450	40	30	36.77
9	150	53	30	25.27
10	300	53	12	25.66
11	450	50	48	26.04
12	150	50	12	25.51
13	300	50	30	26.52
14	300	50	30	26.91
15	300	50	30	26.46

Cuadro 20: *Análisis de varianza del modelo de respuesta del % de grado de hidrólisis con la lipasa DF Amano 15*

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: Concentración	2.34621	1	2.34621	1.58	0.2639
B: Temperatura	162.09	1	162.09	109.36	0.0001
C: Tiempo	4.62331	1	4.62331	3.12	0.1376
AA	0.558006	1	0.558006	0.38	0.5663
AB	0.0821714	1	0.0821714	0.06	0.8232
AC	0.6241	1	0.6241	0.42	0.5450
BB	6.15686	1	6.15686	4.15	0.0971
BC	7.82423	1	7.82423	5.28	0.0700
CC	2.65985	1	2.65985	1.79	0.2380
Residuo	7.41095	5	1.48219		
Total	240.245	14			

El cuadro 20 contribuye a explicar estadísticamente el modelo de respuesta del % de grado de hidrólisis con la lipasa DF Amano 15, lo cual indicó que el valor-p de la variable Temperatura es menor al 0.05 a un nivel de confianza del 95%, teniendo así un efecto significativo en la variable respuesta, es decir, que el aumento o disminución de esta variable afectará el % de grado de hidrólisis. Mientras que, las variables concentración, tiempo e interacciones entre las variables concentración, tiempo y temperatura son estadísticamente no significativas.

Por otro lado, el coeficiente de determinación para el modelo fue del 96.92% de la variación de los datos observados para el grado de hidrólisis. Por lo tanto, la ecuación obtenida de la variable respuesta %GH, es:

$$GH (\%) = 137.682 + 0.00424255 * X - 4.57864 * Y + 0.765363 * Z \\ + 0.0000172778 * X^2 - 0.000137382 * X * Y - 0.000146296 * X \\ * Z + 0.0458333 * Y^2 - 0.0111714 * Y * Z - 0.0026196 * Z^2$$

Dónde:

GH es el grado de hidrólisis, (%); X es la Concentración enzimática, (U/mL); Y es la Temperatura de hidrólisis (°C) y Z es el Tiempo de reacción (horas).

A continuación, se muestra las gráficas de superficie de respuesta generadas a través del modelo propuesto para el grado de hidrólisis. En la figura 24 se expresa la relación entre la temperatura (Y) y concentración (X) sobre el grado de hidrólisis permaneciendo constante la variable tiempo (Z). En la figura 25 se expresa la relación entre el tiempo (Z) y concentración (X) sobre el grado de hidrólisis permaneciendo constante la variable temperatura (Y). En la figura 26 se expresa la relación entre el tiempo (Z) y temperatura (Y) sobre el grado de hidrólisis permaneciendo constante la variable concentración (X).

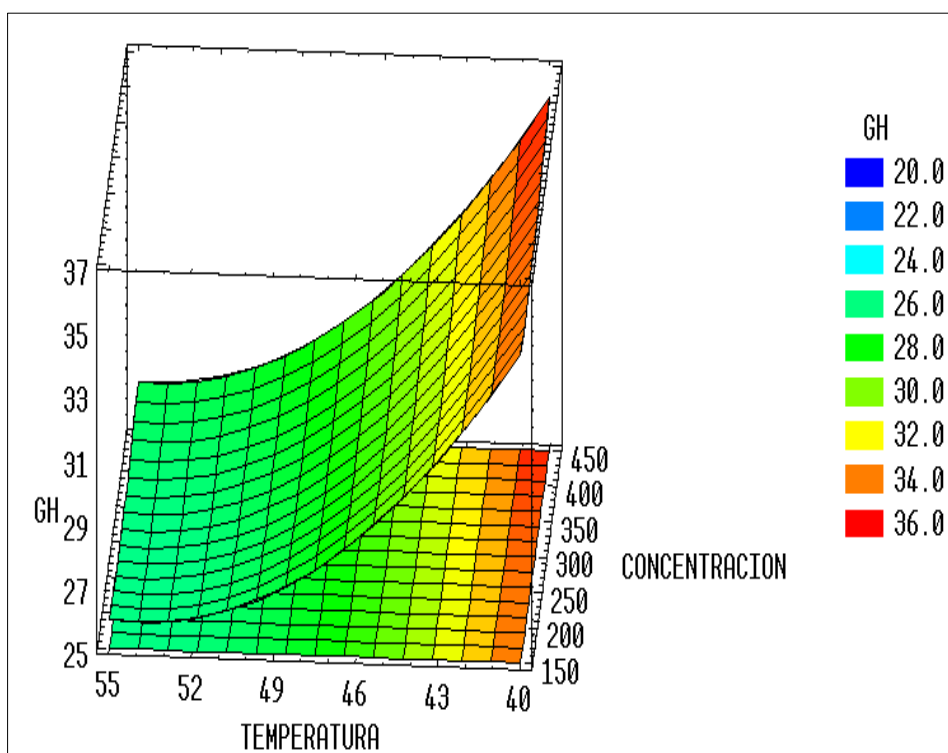


Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción de la temperatura y concentración.

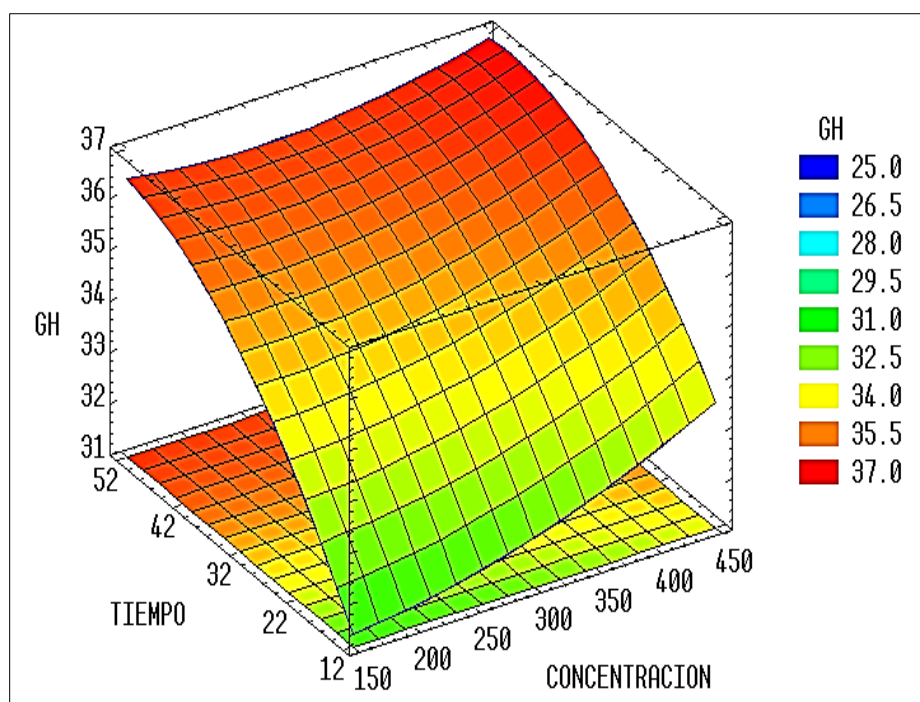


Figura 24. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción del tiempo y concentración.

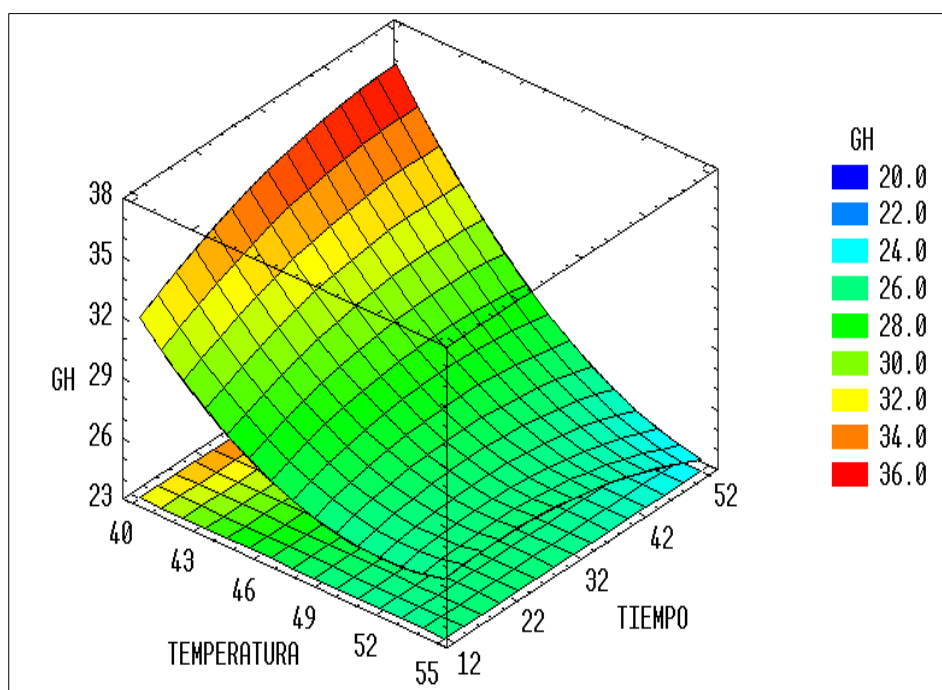


Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo del grado de hidrólisis entre la interacción de la temperatura y tiempo.

4.4.2.1 Efecto de concentración de enzima:

Sobre el grado de hidrólisis en la figura 24 y 25, se observó que a mayor concentración de enzima y en adecuadas condiciones presenta mejores resultados. Esto es debido al efecto de la concentración, ya que a mayor concentración de enzima en la mezcla a hidrolizar tendrá un mayor sitio activo que será disponible para que los enlaces esterres del sustrato sean hidrolizados, de modo que, no se dé una saturación enzima-sustrato.

4.4.2.2 Efecto de la temperatura:

Sobre el grado de hidrólisis en la figura 24 y 26, se observó que a menor temperatura presenta mejores resultados, ya que al aumentar la temperatura se mostró una influencia negativa en la reacción. Esto se debe a que el rango de estabilidad térmica de la lipasa DF Amano 15 se encontró entre los 35 - 45°C, de modo que, someter a la enzima a extensos periodos de tiempo donde se sobrepase su temperatura óptima causa la desnaturalización de esta y por ende impide su acción catalítica (Goswani *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2009).

4.4.2.3 Efecto del Tiempo:

Sobre el grado de hidrólisis en la figura 25 y 26, se observó que a mayor tiempo presenta mejores resultados. Ya que a mayor tiempo de reacción de la enzima con el sustrato habrá mayor liberación de ácidos grasos aumentando así el grado de hidrólisis (%); sin embargo, este efecto del tiempo dependerá de la temperatura de reacción ya que como se observa en la figura 26 a mayor tiempo y menor temperatura se obtuvo un mayor grado de hidrólisis (%).

4.4.3 Optimización del proceso de hidrólisis enzimática

La optimización del proceso de hidrólisis por la acción catalítica de la lipasa DF Amano 15 tras el diseño experimental de Box-Behnken, tuvo como fin maximizar los valores de grado de hidrólisis, como se muestra en el Cuadro 21.

Cuadro 21: *Optimización de respuesta del proceso de hidrólisis enzimática*

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración (U/mL)	150.0	450.0	449.881
Temperatura (°C)	40.0	53.0	40.0
Tiempo (h)	12.0	48.0	47.532
GH (%)			36.8957

El cuadro 21 presenta la optimización de variable para la obtención del mayor grado de hidrólisis, el cual para la lipasa DF AMANO 15 fue una concentración enzimática de 449.8 U/mL; una temperatura de 40 °C y un tiempo de reacción de 48 horas el cual reporta 36.9% de grado de hidrólisis.

En relación a lo mencionado, se comprobó la validez de los resultados de optimización realizando el proceso de hidrólisis por triplicado con las condiciones óptimas, teniendo como resultado lo siguiente:

Cuadro 22: *Grado de hidrolisis (%) teórico y experimental.*

Factor	Óptimo	Teórico (%)	Experimental (%)
Concentración (U/mL)	450		
Temperatura (°C)	40	36.896	36.265
Tiempo (h)	48		

4.5 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados

Para la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados se pasó por tres etapas de enfriamiento propias del método de hibernación, siendo este un método físico de apoyo para concentrar ácidos grasos poliinsaturados como lo menciona Bonilla & Hoyos (2018). Se muestra en la figura 27 el aceite en el proceso de hibernación el cual paso por la prueba de enturbamiento, punto de fusión y prueba de frío de la cual se obtuvo una muestra sólida que fue separada mediante filtración con la finalidad de obtener la mayor concentración de AGPI en la muestra.

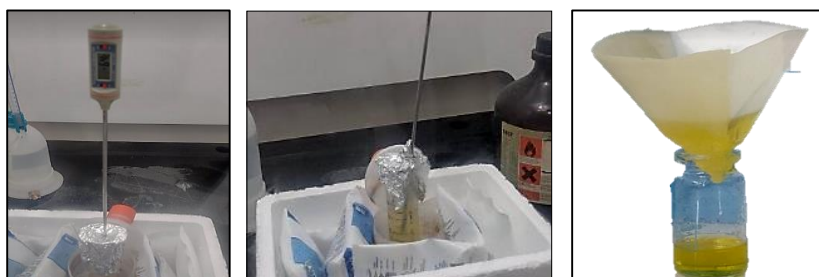


Figura 26. *Proceso de obtención de aceite concentrado*

4.5.1 Ensayos experimentales para determinar composición de ácidos grasos

Se tomó en consideración los cuatro ensayos con mayor grado de hidrólisis para determinar su composición de ácidos grasos una vez realizado el proceso de hibernación, que en dicho caso fueron los que tuvieron en común la variable temperatura de 40°C.

Cuadro 23: *Ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis*

Muestra	Concentración (U/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (H)	Grado de Hidrólisis (%)
2	300	40	48	35.61
3	150	40	30	35.47
5	300	40	12	30.95
8	450	40	30	36.77

Con referencia al Cuadro 24 se especifica el perfil de ácidos grasos de los cuatro ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis. Durante el proceso de hidrólisis se observó una oxidación lipídica propio del proceso tal como lo menciona Encinas (2021); sin embargo, al aplicar el método de hibernación este separó los ácidos grasos saturados de los insaturados mediante los puntos de fusión y concentró la mayor cantidad de AGPI.

Cuadro 24: *Perfil de ácidos grasos de los ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis*

Nomenclatura	Nombre común	Muestras (%)			
		2	3	5	8
C14:0	Ácido Mirístico	5.930	8.313	8.271	6.201
C16:0	Ácido Palmítico	19.430	18.675	19.219	19.854
C18:0	Ácido Esteárico	3.489	3.003	3.183	2.959
C20:0	Ácido Araquídico	0	0	0	0
C22:0	Ácido Behénico	0	0	0	0
C23:0	Ácido Tricosanoico	0	0	0	0
C24:0	Ácido Tetracosanoico	0	0	0	0
Total AGS		28.849	29.991	30.673	29.014
C24:1	Ácido Nervónico	0	0	0	0
C22:1	Ácido Erúico	0	0	0	0
C20:1	Ácido Gadoleico	0	0	0	0
C18:1 VAC	Ácido Vaccénico	0	0	0	0
C18:1 OLE	Ácido Oleico	13.925	14.101	13.866	15.012
C16:1	Ácido Palmitoleico	9.309	7.611	7.626	7.753
C14:1	Ácido Mirístoleico	0	0	0	0
Total AGM		23.234	21.712	21.492	22.765
C20:4 (n-6)	Ácido Araquidónico	0	0	0	0
C20:2 (n-6)	Ácido Eicosadenoico	0	0	0	0
C18:2 (n-6)	Ácido Linoleico	4.125	4.562	4.195	4.105
Total AGP n-6		4.125	4.562	4.195	4.105
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- γ -linolénico	0	0	0	0
C18:3 (n-3)	Ácido γ -linolénico	3.271	3.457	3.230	3.295
C20:5 (n-3)	Ácido eicosapentaenoico - EPA	22.805	22.609	22.564	22.645
C22:6 (n-3)	Ácido docosahexaenoico - DHA	17.716	17.668	17.847	18.176
Total AGP n-3		43.792	43.734	43.641	44.116

En el Cuadro 25, se observó que el ensayo 8 tuvo el mayor aumento de AGPI en comparación con las demás teniendo una concentración de 450 (U/mL) en un tiempo de reacción de 30 horas obteniendo un 2.78%. El ensayo 3 con una concentración de 150 (U/mL) en un tiempo de reacción de 30 horas obtuvo un aumento de 2.40% de AGPI. Por último, el ensayo 2 con una concentración de 300 (U/mL) en un tiempo de reacción de 48 horas obtuvo un aumento de 2.45% de AGPI; mientras que, el ensayo 5 con una misma concentración, pero en un tiempo de reacción de 12 horas solo obtuvo un aumento de 2.3%, siendo este el menor % de AGPI entre los cuatro ensayos.

Cuadro 25: *Variación de AGPI de los ensayos experimentales con mayor % de grado de hidrólisis*

Nomenclatura	Nombre común	Muestras (%)			
		2	3	5	8
C18:3 (n-3)	Ácido γ -Linolénico	3.271	3.457	3.230	3.295
C20:5 (n-3) - EPA	Ácido Eicosapentaenoico	22.805	22.609	22.564	22.645
C22:6 (n-3) - DHA	Ácido Docosahexaenoico	17.716	17.668	17.847	18.176
Total AGPI ω-3		43.792	43.734	43.641	44.116

Se presenta en el Cuadro 26 la composición de ácidos grasos del aceite semirefinado de anchoveta inicial y concentrado, comparando así el aumento del % de AGPI.

Cuadro 26: *Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite semirefinado de anchoveta inicial y concentrado*

Nomenclatura	Nombre común	Muestra (%)	
		Aceite inicial	Aceite concentrado
C14:0	Ácido Mirístico	8.621	8.386
C16:0	Ácido Palmítico	19.428	17.631
C18:0	Ácido Esteárico	3.445	2.764
C20:0	Ácido Araquídico	0	0
C22:0	Ácido Behénico	0	0
C23:0	Ácido Tricosanoico	0	0
C24:0	Ácido Tetracosanoico	0	0
Total AGS		31.494	28.781
C24:1	Ácido Nervónico	0	0
C22:1	Ácido Erúcico	0	0
C20:1	Ácido Gadoleico	0	0
C18:1 VAC	Ácido Vaccénico	0	0
C18:1 OLE	Ácido Oleico	15.021	13.068
C16:1	Ácido Palmitoleico	7.681	7.258
C14:1	Ácido Mirístoleico	0	0
Total AGM		22.702	20.326
C20:4 (n-6)	Ácido Araquidónico	0	0
C20:2 (n-6)	Ácido Eicosadenoico	0	0
C18:2 (n-6)	Ácido Linoleico	4.464	4.736
Total AGP n-6		4.464	4.736
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- γ -linolénico	0	0
C18:3 (n-3)	Ácido γ -linolénico	3.037	3.297
C20:5 (n-3)	Ácido Eicosapentaenoico - EPA	21.660	23.997
C22:6 (n-3)	Ácido Docosahexaenoico - DHA	16.642	18.861
Total AGP n-3		41.339	46.155

Tras el proceso de hidrólisis en la muestra óptima se dio la concentración de AGPI mediante el método de hibernación, el cual tuvo como finalidad separar los ácidos grasos saturados de los insaturados, ya que gracias a la curva de enfriamiento y los puntos de fusión permitió extraer la parte oleica que contenía la mayor concentración de AGPI. Es por ello, que se mostró un aumento en la cantidad de AGPI ω -3 y una disminución del contenido de AGS los cuales fueron un aumento de 4.81% y una disminución de 2.71%, respectivamente.

Otros autores como Cunha *et al.*, (2009) y Encinas (2021) reportaron un incremento de 9.2% y 3.11% de AGPI; en comparación a los datos obtenidos en esta investigación tras aplicar el mismo método de concentración, se encontró entre el % de AGPI de los autores ya mencionados. Es importante destacar que el incremento de este % depende del método físico y el solvente empleado para el proceso de concentración (Bonilla & Hoyos, 2018).

Finalmente, mediante de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se comprobó el aumento de AGPI ω -3, obteniendo un incremento de 4.81% de ácidos grasos poliinsaturados tras el proceso de hidrólisis enzimática con el apoyo de un método de concentración físico demostrando así a pequeña escala su aplicabilidad como alternativa posible de uso industrial.

V. CONCLUSIONES

- La caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta empleada, mostró lo siguiente: índice de acidez (%) de 0.49 ± 0.007 , saponificación (mg de KOH/g) a 186.76 ± 0.21 , peróxidos (meq O_2 /Kg) a 4.56 ± 0.395 , yodo (mg I_2 /g) a 175.87 ± 0.350 , anisidina de 6.80 ± 0.23 , densidad (g/mL) de 0.923 ± 0.003 , encontrándose dentro de los parámetros reportados por otros investigadores y corroborados por las NTP.
- Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del aceite para las tres lipasas; AY “Amano” 30SD, A “Amano” 12, y DF “Amano” 15 determinándose sus temperaturas óptimas de 50, 53 y 40°C, respectivamente.
- Se determinaron las actividades enzimáticas para las tres lipasas; AY “Amano” 30SD con $36\,500 \pm 144.947$ U/mL; A “Amano” 12 con $120\,766.7 \pm 224.184$ U/mL; y DF “Amano” 15 con $178\,573.3 \pm 144.313$ U/mL; encontrándose dentro de lo establecido por el proveedor.
- Se determinaron los parámetros cinéticos de las lipasas: AY “Amano” 30SD con $K_m=0.017$ g/L y $V_{m\acute{a}x}=0.0057$ g/L x min; A “Amano” 12 con $K_m=0.103$ g/L y $V_{m\acute{a}x}=0.0038$ g/L x min; DF “Amano” 15 con $K_m=0.111$ g/L y $V_{m\acute{a}x}=0.0047$ g/L x min, valores que caracterizan cinéticamente cada una de las lipasas en este estudio.
- Se determinó mediante el diseño experimental de Taguchi las dos mejores lipasas entre ellas las lipasas AY “Amano” 30SD y DF “Amano” 15; seleccionándose a la lipasa DF “Amano” 15 por su regioespecificidad.

- Se determinó mediante el diseño experimental de Box-Behnken que el mayor % de grado de hidrólisis enzimática del aceite semi-refinado de anchoveta se obtuvo usando la lipasa DF “Amano” 15 a condiciones óptimas de concentración (449.8 U/mL), temperatura (40°C) y tiempo de reacción (47.5 h) logrando obtener un mayor grado de hidrólisis de 36.27%.
- Se logró obtener la concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los productos de la hidrólisis enzimática del aceite semirefinado de anchoveta, por el método de hibernación alcanzando un aumento de 4.81%, principalmente debido al incremento de EPA y DHA de 4.56% del contenido de AGPI n-3, respecto a la composición de los ácidos grasos del aceite inicial.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros tipos de lipasas con propiedades de regioespecificidad capaz de hidrolizar la posición 1,3 de los triglicéridos, por ejemplo, Candida Antarctica.
- Evaluar otras variables de investigación en el proceso de hidrólisis enzimática para obtener mayor % de grado de hidrólisis, por ejemplo, RPM.
- Evaluar otro método de separación de ácidos grasos saturados de aceite hidrolizado para obtener una mayor concentración de AGPI, por ejemplo, fluidos supercríticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akabas, S. & Deckelbaum, R. (2006) N-3 fatty acids: Recommendations for therapeutic and prevention. *American Journal of Clinical Nutrition*. Consultado el 20 de octubre del 2020. DOI:10.1093/ajcn/83.6.1451S
- Akhter, M., Afzal, N., Haider, Z. & Ali, M. (2015) Inactivation of Lipase enzyme by using Chemicals to maximize Rice Bran Shelf Life and its Edible Oil Recovery. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Volume 6, Issue 6. ISSN 2229-5518. <https://cutt.ly/wmrA2rd>.
- Alarcón, V. (2008) Producción de la Lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el Sistema Pichia pastoris: Caracterización y Aplicación en Reacciones de Síntesis. [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Barcelona]. España. <http://hdl.handle.net/10803/5320>
- Alonso y Chuqui (2019) “Efecto de la mezcla de aceite semi refinado de pescado (*Engraulis Ringens*) con aceite de oliva (*Olea Europaea*) en su estabilidad oxidativa y características fisicoquímicas”. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Santa]. Perú. <https://acortar.link/eeRp4N>
- Andamayo, I. (2021) Blend de aceite de pescado refinado y aceite de sachá inchi. [Tesis de pregrado, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Perú. <https://acortar.link/myydQQ>
- Aranceta, J. y Gil, A. (2010). Capítulo I. *Alimentos Funcionales y salud en la etapa infantil y Juvenil*. (216 p.) Madrid, España: Médica Panamericana.
- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., & Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3

ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science*. Consultado el 29 de agosto del 2023. DOI:10.1042/CS20030326

Armas, J., Mendoza, J., y Martínez, J. (s.f.) Lipasas de origen fúngico con atractivas aplicaciones: producción y caracterización.

Ayinla, Z., Ademakinwa, A., Gross, R., & Agboola, F. (2021). Biochemical and biophysical characterization of a small purified lipase from *Rhizopus oryzae* ZAC3. *Biocatalysis and Biotransformation*. Consultado el 20 de agosto del 2023. DOI:10.1080/10242422.2021.1883006

Bailey, A. (2005). Aceites y grasas industriales. Buenos Aires: *Reverte Argentina S.C.A.*

Baş, D. & Boyacı, I. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*. Consultado el 12 de abril del 2023.

Beer, H., Wohllfahrt, G., Schmid, R. & McCarthy, J. (1996) The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochemi Journal*. Consultado el 28 de abril del 2023. DOI: 10.1042/bj3190351

Benítez, R., Ibarz, A. y Jordi Pagan J. (2008) Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana. Science Direct*. <https://acortar.link/b2fMVT>

Bernandini, E. (1986) *Tecnología de aceites y grasas. Aceites y grasas*. Editorial Alhambra. España.

Bhandari, K., Chaurasia, S. & Singh, K. (2017) Kinetics of enzymatic hydrolysis of Indian tuna fish oil using *Candida rugosa* lipase. *Revista India de Biotecnología*. 16 (3): 413-418. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/43328>.

- Bhandari, K., Chaurasia, S., Dalai, A., Gupta, A., & Singh, K. (2013). Kinetic study on enzymatic esterification of tuna fish oil fatty acids with butanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Consultado el 18 de marzo del 2023. DOI:10.1016/j.molcatb.2013.05.006.
- Bonilla, J. & Hoyos J. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Consultado el 25 de junio del 2022.
- Breslow, J. (2006) N-3 fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. DOI:10.1093/ajcn/83.6.1477S
- Cachago, I. (2015) “Estudio de hidrólisis en aceite de coco virgen (*Cocus nucífera*) mediante el uso de lipasas inmovilizadas aplicando el diseño de superficie de respuesta”. [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Ecuador.
- Camacho, T. (2014). *Diferentes métodos para cuantificar la actividad enzimática en hidrolasas de importancia comercial*. Ambato, Ecuador.
- Campos, A. (2017). Optimización de la temperatura de secado y presión de vacío en la decoloración del aceite crudo de pescado. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Del Santa]. Perú. <https://acortar.link/RIeZZK>
- Carvalho, P., Campos, P., Noffs, M., Fregolente, P., & Fregolente, L. (2009). Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: optimization of process parameters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Consultado el 14 de agosto del 2023. DOI:10.1590/S0103-50532009000100019

- Casas, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. & Marty, A. (2012) Lipases: An overview. En Sandoval G (Ed.) Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. *Springer Protocols*. DOI:10.1007/978-1-61779-600-5_1
- Cedrés, J., Rébak, G., Patiño, E., Sánchez, M., y Tuñón, G. (2013). Ácidos grasos de lípidos intramusculares y grasa de cobertura en búfalos suplementados con aceite de pescado. *Revista veterinaria*.
- Cert, R. (2017). Estudio de la Estabilidad Oxidativa de aceites funcionalizados con derivados de Hidroxitirosol. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. España. <https://acortar.link/cZ3Csn>
- Chamorro, A., Pacheco, M. y Tamayo, M. (2016) Estudio científico sobre la adición de Omega-3 (DHA/EPA) para el mejoramiento cognitivo de niños menores de cinco (5) años. [Tesis de pregrado, Unilasallista Corporación Universitaria]. Antioquía. <https://cutt.ly/ZmtWKrs>
- Cujilema, M., León, G., Porro, M., Ruiz, L., y Ramos, L. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: Influencia del pH. *Revista Centro Azúcar*. Consultado el 14 de agosto del 2023. <https://cutt.ly/dJS2S3d>.
- Cunha, D., Crexi, V., & De Almeida, L. (2009). Winterization of fish oil with solvent. *Food Science and Technology*. Consultado el 10 de setiembre del 2023. DOI:10.1590/s0101-20612009000100032
- De Caterina, R. (2011) N-3 Fatty acids in cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. DOI:10.1056/nejmra1008153

- De Souza, F., Soares, C., Lima, A., & De Aquino, L. (2020). Caracterización de una lipasa “verde” de *Aspergillus niger* inmovilizada sobre membranas de polietersulfona. *Acta Scientiarum. Tecnología*.
- Dobrev, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., & Krastanov, A. (2011). Characterization of Crude Lipase from *Rhizopus Arrhizus* and Purification of Multiplicity Forms of the enzyme. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. DOI:10.5504/bbeq.2011.0003
- Encinas, G. & Castillo, A. (2021) Kinetic study of a commercial lipase for hydrolysis of semi-refined oil of anchovy (*Engraulis ringens*). *Journal of Nanotechnology*. DOI:10.32829/nanoj.v5i1.146
- Esquivel, L., Campos, A., y Castillo, W. (2017). Optimización de la temperatura de secado y presión de vacío en la decoloración y composición del aceite crudo de pescado. *Revista Investigación Altoandina*.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación), 2012. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Ginebra, España.
- Fuentes, J., Guerrero, M. y Viader, J. (2017) Secuencia de la tiansa de *aspergillus niger* gh1 y producción de la enzima en *pichia Pastoris*. *CIENCIA UANL. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León*. <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=6928>.
- Gentili, A., Curini, R., Cernia, E., & D' Ascenzo, G. (1996). Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase.
- Global Organization for EPA and DHA (2020) Global Organization for EPA and DHA Omega 3. *Ciencia omega 3*. <https://goedomega3.com/>

- González, J., Moreno, V. y Del Monte, A. (2010) Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colomb. Biotecnol.* <https://cutt.ly/DmtPcNY>
- Goswami, D., De, S., & Basu, J. (2012). Effects of Process Variables and Additives on Mustard Oil Hydrolysis by Porcine Pancreas Lipase. *Revista Brasileira de Ingeniería Química*. DOI:10.1590/S0104-66322012000300002
- Grompone, M. (s.f.) *Aceites de pescados de interés nacional*. pp. 14–19. <https://cutt.ly/NJS7922>
- Guillén, M. (2012). Caracterización, inmovilización y aplicación en biocatálisis de la lipasa de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. Bellaterra. <https://goo.su/zrYhCZ>
- Hasan, F., Shah, A. & Hameed, A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology. Adv.* 27: 782-798. DOI:10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Hennekens, C., Albert, C., O'Donnell, C., Ajani, U., Carey, V., Willett, W., Ruskin, J., & Manson, J. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*. DOI:10.1001/jama.279.1.23
- Hibbeln J, Nieminen L, Blasbalg T, Riggs J, Lands W. (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity *American Journal of Clinical Nutrition*. DOI:10.1093/ajcn/83.6.1483S
- Ixtaina, V. (2010). Caracterización de la semilla y el aceite de chía (*Salvia Hispánica* L.) obtenido mediante distintos procesos y aplicación en tecnología de alimentos.

- [Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata]. Buenos Aires.
<https://acortar.link/5WB2Wg>
- Kahveci, D., & Xu, X. (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Science Direct*. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.05.142
- Kashiwagi, S., & Huang, L. (2012). Dietary Supplements and Cardiovascular Disease: What is the Evidence and What Should We Recommend? Cardiovascular Risk Factors. <https://acortar.link/uPM9fO>
- Lecerf, M. y Vancassel, S. (2012). Los Ácidos grasos y la salud. *The Scientific American*, (427, 96 p.). Barcelona: *Prensa Científica*. <https://cutt.ly/HJDy4e5>
- Lee, J., O'Keefe, J., Lavie, C., Marchioli, R. & Harris, W. (2008) Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc*. 83: 324-32. DOI:10.4065/83.3.324
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of American Chemical Society*.
- Liu, Y., Ramakrishnan, V. y Dave, D. (2020) Clase de lípidos y composición de ácidos grasos del aceite extraído de subproductos del salmón del Atlántico bajo diferentes parámetros de optimización de la hidrólisis enzimática. *Biocatálisis y Biotecnología Agrícola*. DOI:10.1016/j.bcab.2020.101866
- Llerena, T. y Aranda, D. (2017) *Extracción y caracterización del aceite crudo obtenido de un hidrolizado enzimático de residuos frescos de anchoveta (Engraulis ringens)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina] Perú.
<https://cutt.ly/wJDrOHR>

- López, J., Benaiges, M. & Valero, F. (2020). Rhizopus oryzae lipase, a promising industrial enzyme: biochemical characteristics, production and biocatalytic applications. *Catalysts*. DOI: 10.3390/catal10111277
- López, C., Guerra, N., & Rúa, M. (2000). Purification and characterization of two isoforms from Candida rugosa lipase B. *Biotechnology Letters*. DOI:10.1023/a:1005697419227
- López, J. y García, F. (2015) Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática. *Revista Eubacteria*. Cien años de avances en ciencias de la vida. ISSN 1697-0071
- Lotti M., Grandori R., Fusetti F., Longhi S., Brocca S., Tramontane A. & Alberghina L. (1993). Cloning and analysis of Candida cylindracea lipase sequences. *Gene*. DOI:10.1016/0378-1119(93)90760-z
- Mayel, M., Nwuche, C., Chimaobi, V., Eze, S. y Chilaka, F. (2020). Estudios comparativos sobre las propiedades cinéticas de las lipasas purificadas de Aspergillus nidulans y Aspergillus niger LC 269109. *Biochemical Molecular Biology*.
- Morales, R., Muñío, M., Guadix, A., Guadix, E. y Camacho, F. (2018). A lumped model of the lipase catalyzed hydrolysis of sardine oil to maximize polyunsaturated fatty acids content in acylglycerols. *Food Chemistry*. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.07.030
- Morales, R., Muñío, M., Pérez, R., Guadix, A. y Guadix, E. (2013). Lipids from marine sources. En Pérez R. y Pascal J. (Ed.). *Utilization of fish waste*. (232 p.) Boca Raton, EE. UU.: CRC Press.

- Nakajima, T., Edwinoliver, N., Maeda, H., Thirunavukarasu, K., Gowthaman, M., Masaki, K., y Kamini, N (2012). Purificación, clonación y expresión de una lipasa de *Aspergillus niger* para la degradación de poli (ácido láctico) y poli (ϵ -caprolactona). Degradación y estabilidad de polímeros.
- Nasiff, A. y Meriño, E. (2003) Ácidos Grasos Omega-3: Pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. Lo Bueno y Lo Malo. *Rev. Cubana Med.*, vol. 42, no. 2, pp. 49 - 55. <https://cutt.ly/eJDyl5D>
- Navas, P. (2010). Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. [Tesis de postgrado, Universidad de Castilla-La Mancha]. España. <https://acortar.link/23nQFu>
- Oshima, A., Kosugi, Y., Koike, S. Fukatsu, M., Minami, K., Miyake, Y. & Masui, K. (2002). Determination of Fatty Acid Composition at sn-2 Acyl Position in Triacylglycerol by Capillary Gas Chromatography with Lipase from *Rhizopus delemar*. *Journal of Oleo Science*. DOI:10.5650/jos.51.599
- Oztürk, B. (2001) *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. [Master of Science, İzmir Institute of Technology]. Turkey. <http://hdl.handle.net/11147/3741>
- Pinto, G. (2013) Evaluación de influencia de la materia prima y la temperatura de separación, en la calidad del aceite de anchoveta (*Engraulis ringens*). [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Agustín]. Perú. <https://acortar.link/jjwqx8>
- Rivas, R. (2015). Aplicaciones farmacéuticas de las lipasas microbianas. <https://acortar.link/jzbaGB>

- Robalino, J. (2009). Aprovechamiento de Residuos Pesqueros para la Obtención de Ácidos grasos Omega-3 en el procesamiento de productos alimenticios. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnico del Litoral]. Ecuador. <https://acortar.link/OLku2m>
- Roldan, D. (2016) *Extracción y Refinación de aceite crudo de pescado*. Universidad Nacional Agraria la Molina. <https://cutt.ly/9JDd3H4>
- Rubio, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S., Sanz, M., & Carballido, J. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 1-12. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.10.006
- Rubio, N., Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2012). Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: a comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*. Consultado el 13 de agosto de 2023. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011
- Salaberría, F. (2018). *Propiedades biocatalíticas de lipasas de origen vegetal*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Sur]. Argentina. <https://cutt.ly/cQelabp>.
- Salah, B., Fendri, K. & Gargoury, Y. (1994) La lipase de *Rhizopus oryzae*: Production, purification et caractéristiques biochimiques, *Revue Fr. Corps. Gras*. DOI: 10.1051/ocl.2002.0043
- Salas, A., Ayala, M., y Albrecht, M. (2003). Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante el periodo 1996-2000. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.

- Salem, N., Litman, B., Kim, H. & Gawrish, K. (2001) Mechanism of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36: 945-959. DOI: 10.1007/s11745-001-0805-6
- Sanhueza, J., Nieto, S. y Valenzuela, A. (2009). Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y ciencia de alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*. DOI:10.4067/S0717-75182009000300007
- Schipper (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. The *Rhizopus stolonifer* group and the *Rhizopus oryzae*. *Studies in Mycology*. Consultado el 18 de Agosto de 2023 en <https://cutt.ly/rJDsrW8>
- Sharma, A., Chaurasia, S. & Dalai, A. (2013) Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Science Direct Catalysis Today*. DOI:10.1016/j.cattod.2012.05.006
- Simopoulos, A. (2001) Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. *World Rev Nutr Diet*. Consultado el 18 de Agosto de 2023 en <https://acortar.link/7rbTjV>
- Strehl Schübel-Hopf & Partner (2021) *Método para fabricar alimentos que contienen almidón*.
- Tan, C., Show, P., Ooi, C., Ng, E., Lan, J. & Ling, T. (2015) Novel lipase purification methods -a review of the latest developments. *Biotechnology Journal*. DOI:10.1002/biot.201400301
- Uauy, R. y Gerber, M. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición*. <https://cutt.ly/MJDdZRo>
- Urquijo, M., Fontalvo, M., Veloso, A. y Mendoza, D. (2020) Hidrólisis enzimática del aceite de *Bactris guineensis* con fracciones del látex de *Carica papaya*: estudio del

- efecto de la temperatura, pH y concentración del sustrato. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. DOI: 10.18684/bsaa(18)70-81
- Valenzuela, A. (1999) Consumption pattern of dietary fats in Chile: n-6 and n-3 fatty acids. *Int. J. Food Sci. Nutr.* DOI: 10.1080/096374899101328
- Valenzuela, A. (2009) Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper development of the brain and visual function. *Grasas y Aceites*. DOI:10.3989/gya.085208
- Valenzuela, A. y Nieto, S. (2003) Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Pediatr* 74: 149-159. DOI: 10.4067/S0370-41062003000200002.
- Valenzuela, R., Tapia, G., González, M., y Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*. <https://acortar.link/4UhBR4>
- Windsor, M. y Barlow, S. (1984) Introducción a los subproductos de pesquería. Editorial Acribia, Zaragoza. España.
- Zheng-Yu S., Jiang-Ke Y. y Yun-Jun Y. (2007). Purificación y caracterización de una lipasa de *Aspergillus niger* F044. *Revista china de biotecnología*, 23 (1), 96-101. <https://cutt.ly/XJDgOIe>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica de las lipasas comerciales obtenidas de AMANO ENZYME

Anexo 1A: Lipase "A Amano 12"

CERTIFICATE OF ANALYSIS

P/O# SAMPLE

Date 8/23/2021

Messrs. Universidad Nacional del Santa

Product: Lipase A " Amano " 12

Lot No.: LT04U2801K

Quantity: 20 g

Date Assayed:

5/10/2021

Test Items	Specification	Test Results
Loss on Drying: (1 g, 105°C, 4 hrs)	Not more than 8.00%	5.71
Lead (Pb): FCC Method	Not more than 5 mg/kg	Not more than 5 mg/kg
Lipase Activity: Amano Method, pH 6.0	Not less than 120,000 u/g	139,000 u/g
Protease Activity: Food Additives Amano method, pH 3.0	Not more than 2,500 u/g	1,220 u/g
Total Viable Aerobic Count:	Not more than 1,000/g	Not more than 1,000/g
Coliforms:	Not more than 30/g	Not more than 30/g
E.coli:	Negative/25g	Negative/25g
Salmonella:	Negative/25g	Negative/25g
Fungi (molds and yeasts):	Not more than 100/g	Not more than 100/g
	Judgment	Pass

Remark:

Quality Control
Manager

Yoshiki RW 5/10/21

Prepared
by

Janet 5/10/21

AMANO

Amano Enzyme USA Co., Ltd.

1415 Madeline Lane, Elgin, IL 60124, USA
Tel: (847) 649-0101 Fax: (847) 649-0205

Anexo 1B: Lipase "AY Amano 30SD"**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

P/O# SAMPLE

Date 8/23/2021

Messrs. Universidad Nacional del Santa

Product: Lipase AY " Amano " 30SD

Lot No.: LAYS11U1601SDK

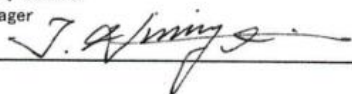
Quantity: 20 g

Date Assayed:

11/24/2020

Test Items	Specification	Test Results
Loss on Drying: (1 g, 105°C, 4 hrs)	Not more than 10.0%	3.66%
Lead (Pb): FCC Method	Not more than 5 mg/kg	Not more than 5 mg/kg
Lipase Activity: Amano LMAP Method, pH 7.0	Not less than 30,000 u/g	36,100 u/g
Total Viable Aerobic Count:	Not more than 1,000/g	Not more than 1,000/g
Coliforms:	Not more than 30/g	Not more than 30/g
E. coli:	Negative/25g	Negative/25g
Salmonella:	Negative/25g	Negative/25g
Fungi (molds and yeasts):	Not more than 100/g	Not more than 100/g
	Judgment	Pass

Remark:

Quality Control
Manager 11/24/20Prepared
by 11/24/20

Amano Enzyme USA Co., Ltd.

1415 Madeline Lane, Elgin, IL 60124, USA
Tel: (847) 649-0101 Fax: (847) 649-0205

Anexo 1C: Lipase "DF Amano 15"

P/O# SAMPLE

CERTIFICATE OF ANALYSIS

No. 000309168

Date 8/23/2021

Messrs. Universidad Nacional des Santa

Product: Lipase DF "Amano" 15

Lot No.: LDFT0751214K

Quantity: 20 g

Date Assayed: Jul.19,2021

Test Items	Specification	Test Results
Loss on drying: (1g, 105°C, 4hr.)	Not more than 8.00 %	0.97 %
Lead: FCC method	Not more than 5 $\frac{mg}{g}$	Not more than 5 $\frac{mg}{g}$
Lipase activity: FCC FIP Method pH7.0	Not less than 150 $\frac{U}{g}$	179 $\frac{U}{g}$
Total viable aerobic count:	Not more than 1,000 CFU/g	Not more than 1,000 CFU/g
Coliforms:	Not more than 30 /g	Not more than 30 /g
Escherichia coli:	Negative/25g	Negative/25g
Judgment		Pass

Remark:

Date Manufactured: Jul.12,2021

Best before: Jan.11,2023

SAMPLE

Quality Control
Manager

Sukiha

Prepared by

Hizo



Amano Enzyme Inc.

Head Office

2-7, 1-chome, Nishiki, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-8630 JAPAN

Tel: +81. (0) 52. 211. 3032

Fax: +81. (0) 52. 211. 3054

Nagoya Plant

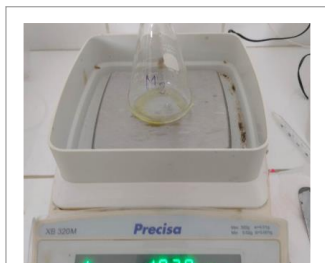
27, Hanno, Kunotsubo, Kitanagoya, Aichi 481-8533 JAPAN

Tel: +81. (0) 568. 21. 3883

Fax: +81. (0) 568. 22. 1954

Anexo 2: Caracterización fisicoquímica del aceite semirefinado de anchoveta

A. Índice de Acidez



Se pesó la muestra de aceite en un matraz, y se agregó 50 mL de alcohol neutralizado.



Se adicionó 2 gotas de fenolftaleína y KOH.



Se tituló con KOH, y se tomaron nota los valores obtenidos.

B. Índice de Saponificación



Se pesó la muestra de aceite en un matraz.



Se agregó 50 mL de solución etanólica de KOH.



Se enfrió y tituló con HCl 0.5 N, se hizo una muestra blanco.

C. Índice de Peróxidos



Se pesó 5g de la muestra de aceite en un matraz.

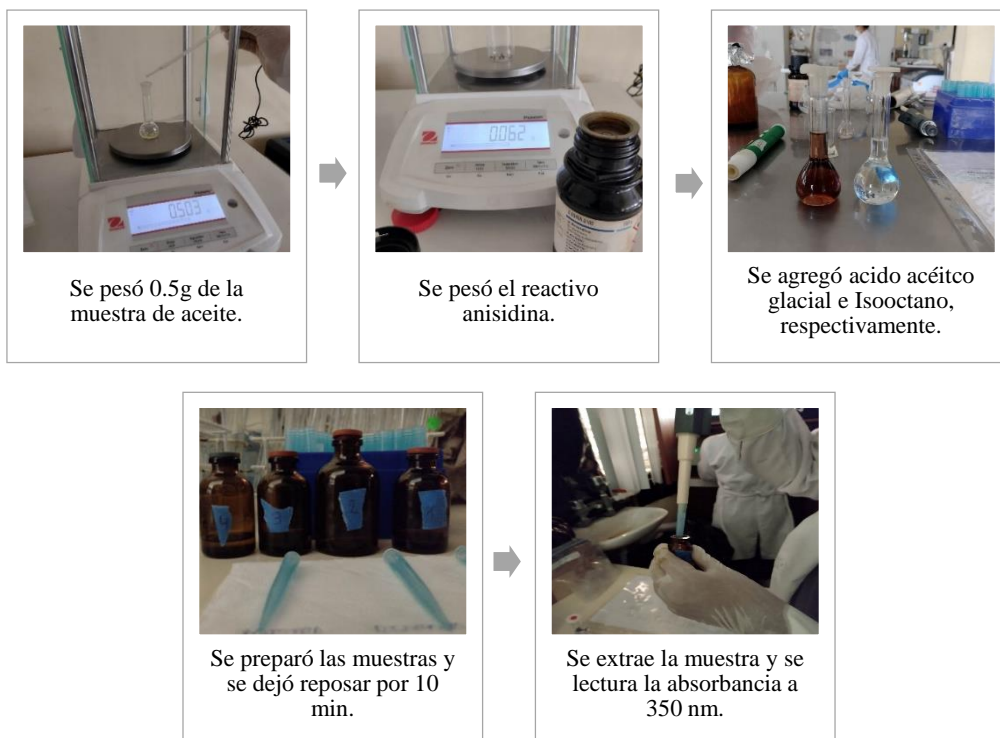


Se agregó 30 mL de solución de ácido acético: cloroformo, y se agitó.

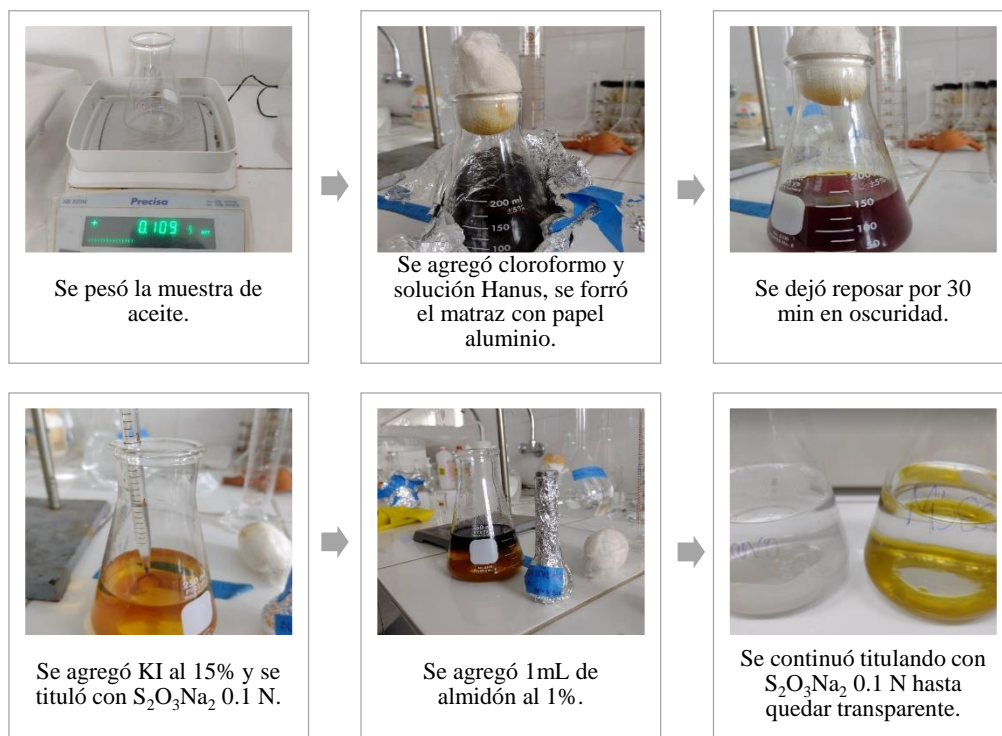


Se agregó solución saturada de KI, y se tituló con $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0.1 N.

D. Índice de Anisidina



E. Índice de Yodo



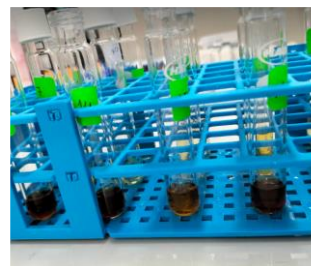
F. Determinación del perfil de ácidos grasos



Se pesó la muestra de aceite.



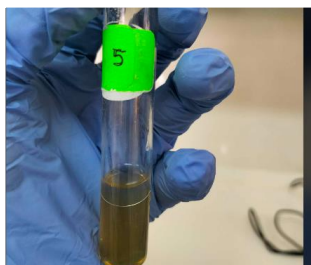
Se agregó NaOH, se cubrió con N_2 , se agitó y calentó por 5 min.



Se agregó BF_3 , se cubrió con N_2 , se agitó y calentó por 30 min.



Se agregó isooctano, se cubrió con N_2 y se agitó.



Se agregó NaCl, se cubrió con N_2 y se agitó.

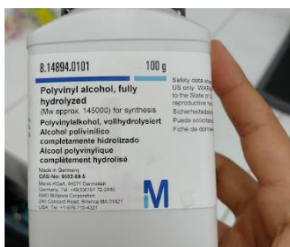


Se extrajo la fase acuosa a un vial.

Anexo 3: Determinación del rango de linealidad y actividad enzimática de las lipasas comerciales.

Anexo 3A. Evidencias del proceso de la determinación de la actividad enzimática de las lipasas comerciales

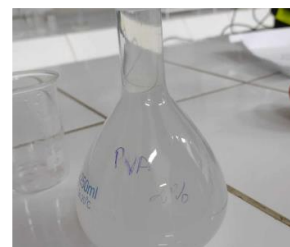
a) Preparación del Alcohol Polivinílico al 2%



Se seleccionó el alcohol polivinílico completamente hidrolizado



Se pesó el alcohol polivinílico y se disolvió en agua entre 80-90°C. Se agitó constantemente

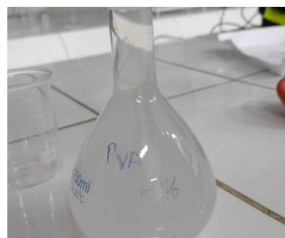


Se filtró la preparación y aforó el matraz con agua destilada.

b) Preparación de la emulsión



Se agregó 25% de aceite de oliva extravirgen del volumen total.

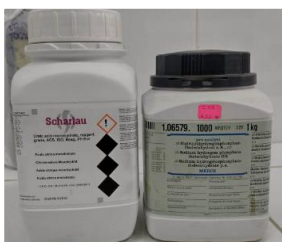


Se agregó 75% de PVA al 2% del volumen total.



Se agitó constantemente hasta obtener una emulsión homogénea.

c) Preparación de la solución tampón citrato-fosfato



Se pesó ácido cítrico y fosfato de sodio dibásico.



Se diluyó cada reactivo y aforó en una fiola, respectivamente.



Se extrajo 65mL de ácido cítrico y 435 mL de fosfato de sodio dibásico, y aforó a 1 L.

d) Proceso de la hidrólisis enzimática de la lipasa comercial



Anexo 3B. Efecto de la temperatura para hallar la actividad de las lipasas comerciales

Cuadro 27: Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “AY AMANO 30SD”

N°	T (°C)	mL NaOH (Blanco):	mL NaOH:		Promedio muestras (mL)	Volumen de muestra (mL)	μmol acid graso/ mL muestra	μmol acid graso/ mL muestra*min
			M1	M2				
1	35	0.130	0.15	0.15	0.150	0.5	2.000	0.1333
2	40	0.120	0.15	0.14	0.145	0.5	2.500	0.1667
3	45	0.110	0.15	0.14	0.145	0.5	3.500	0.2333
4	48	0.110	0.15	0.15	0.150	0.5	4.000	0.2667
5	50	0.100	0.16	0.15	0.155	0.5	5.500	0.3667
6	53	0.110	0.15	0.15	0.150	0.5	4.000	0.2667
7	55	0.110	0.14	0.13	0.135	0.5	2.500	0.1667
8	60	0.130	0.14	0.13	0.135	0.5	0.500	0.0333

Cuadro 28: *Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “A AMANO 12”*

N°	T (°C)	mL NaOH (Blanco):	mL NaOH:		Promedio muestras (mL)	Volumen de muestra (mL)	μmol acid graso/ mL muestra	μmol acid graso/ mL muestra*min
			M1	M2				
1	40	0.440	0.44	0.45	0.445	0.5	0.500	0.0333
2	45	0.445	0.46	0.45	0.455	0.5	1.000	0.0667
3	50	0.490	0.50	0.51	0.505	0.5	1.500	0.1000
4	53	0.450	0.50	0.48	0.490	0.5	4.000	0.2667
5	55	0.470	0.49	0.49	0.490	0.5	2.000	0.1333
6	57	0.440	0.47	0.43	0.450	0.5	1.000	0.0667
7	60	0.410	0.41	0.43	0.420	0.5	1.000	0.0667
8	65	0.410	0.41	0.42	0.413	0.5	0.250	0.0167

Cuadro 29: *Efecto de la temperatura para hallar la actividad de la lipasa “DF AMANO 15”*

N°	T (°C)	mL NaOH (Blanco):	mL NaOH:		Promedio muestras (mL)	Volumen de muestra (mL)	μmol acid graso/ mL muestra	μmol acid graso/ mL muestra*min
			M1	M2				
1	30	0.380	0.90	0.95	0.925	0.5	54.500	3.6333
2	35	0.380	1.00	1.08	1.040	0.5	66.000	4.4000
3	37	0.390	1.20	1.20	1.200	0.5	81.000	5.4000
4	40	0.390	1.40	1.40	1.400	0.5	101.000	6.7333
5	43	0.390	1.01	1.01	1.010	0.5	62.000	4.1333
6	45	0.390	0.95	0.96	0.955	0.5	56.500	3.7667

Anexo 3C. Determinación de la actividad enzimática de las lipasas comerciales

Cuadro 30: Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “AY AMANO 30SD”

		Blanco (mL NaOH):		0.73			
N°	Tiempo reacción (min)	Actividad enzimática 1:6000		Actividad enzimática 1:7000		Actividad enzimática 1:8000	
		mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra
1	0	0.73	0	0.73	0	0.73	0
2	5	0.84	0.55	0.81	0.4	0.79	0.3
3	10	0.88	0.75	0.83	0.5	0.81	0.4
4	15	0.92	0.95	0.9	0.85	0.87	0.7
5	20	1	1.35	0.95	1.1	0.92	0.95
6	25	1.08	1.75	1.01	1.4	0.97	1.2
7	30	1.13	2	1.06	1.65	1	1.35

Cuadro 31: Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “A AMANO 12”

		Blanco (mL NaOH):		1.00			
N°	Tiempo reacción (min)	Actividad enzimática 1:6000		Actividad enzimática 1:7000		Actividad enzimática 1:8000	
		mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra
1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0
2	5	1.08	0.4	1.07	0.35	1.03	0.15
3	10	1.33	1.65	1.3	1.5	1.24	1.2
4	15	1.59	2.95	1.5	2.5	1.43	2.15
5	20	1.77	3.85	1.69	3.45	1.54	2.7
6	25	1.94	4.7	1.85	4.25	1.76	3.8
7	30	2.3	6.5	2.10	5.5	1.91	4.55

Cuadro 32: *Determinación de la actividad enzimática de la lipasa “DF AMANO 15”*

		Blanco (mL NaOH):		0.59			
N°	Tiempo reacción (min)	Actividad enzimática 1:6000		Actividad enzimática 1:7000		Actividad enzimática 1:8000	
		mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra	mL NaOH	μmol acid graso/ mL muestra
1	0	0.59	0	0.59	0	0.59	0
2	5	1	2.05	0.96	1.85	0.9	1.55
3	10	1.25	3.3	1.10	2.55	1	2.05
4	15	1.45	4.3	1.40	4.05	1.29	3.5
5	20	1.88	6.45	1.64	5.25	1.48	4.45
6	25	2.12	7.65	1.94	6.75	1.69	5.5
7	30	2.45	9.3	2.20	8.05	1.98	6.95

Cuadro 33: *Determinación de actividad enzimática de las lipasas por cada dilución*

Tipo de lipasa	Dilución enzimática	Tiempo (min)	Pendiente lineal	Actividad enzimática (U/mL)
AY “Amano” 30SD	1:6000	20	0.062	37 200
	1:7000	15	0.053	37 100
	1:8000	15	0.044	35 200
A “Amano” 12	1:6000	15	0.202	121 200
	1:7000	15	0.173	121 100
	1:8000	15	0.15	120 000
DF “Amano” 15	1:6000	25	0.299	179 820
	1:7000	15	0.257	179 900
	1:8000	15	0.220	176 000

Anexo 4: Caracterización cinética de las lipasas comerciales mediante la determinación de sus parámetros cinéticos.

Ecuación fundamental (12):

$$\frac{g \text{ acido graso}}{g \text{ muestra}} = \frac{\text{Indice de Acidez} \left(\frac{\mu\text{mol. acido graso}}{\text{ml muestra}} \right) \times PM \text{ acid oleico} (282.4 \text{ g/mol} \times 10^{-6})}{\text{Tiempo de reaccion (min)} \times \text{Densidad del aceite} (0.928 \frac{g}{mL})}$$

Cuadro 34: Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “AY AMANO 30SD”

N°	Emulsión (mL)			Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Densidad (g/mL)	NaOH (mL Muestra) t=15 min	NaOH (mL Blanco) t=0 min	μmol acid graso / mL muestra	g acido/ g muestra
	So (g/L)	Aceite (sustrato)	PVA al 2%							
1	0.6412	0.0175	0.0175	0.0350	22.4650	0.9803	0.93	0.87	0.300	0.0000057629
2	2.5648	0.0700	0.0700	0.1400	22.3600	0.9796	0.86	0.80	0.300	0.0000057670
3	3.2976	0.0900	0.0900	0.1800	22.3200	0.9786	0.86	0.80	0.300	0.0000057728
4	5.1296	0.1400	0.1400	0.2800	22.2200	0.9776	0.82	0.76	0.300	0.0000057788
5	7.6944	0.2100	0.2100	0.4200	22.0800	0.9760	0.86	0.80	0.300	0.0000057883
6	9.7096	0.2650	0.2650	0.5300	21.9700	0.9742	0.86	0.80	0.300	0.0000057990
7	12.8240	0.3500	0.3500	0.7000	21.8000	0.9720	0.86	0.80	0.300	0.0000058121

Cuadro 35: Inversas del sustrato vs velocidad

So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
0.6412	0.000005763	1.5596	173522.852
2.5648	0.000005767	0.3899	173398.945
3.2976	0.000005773	0.3033	173225.4753
5.1296	0.000005779	0.1949	173044.9251
7.6944	0.000005788	0.1300	172761.7092
9.7096	0.000005799	0.1030	172443.0913
12.8240	0.000005812	0.0780	172053.6694

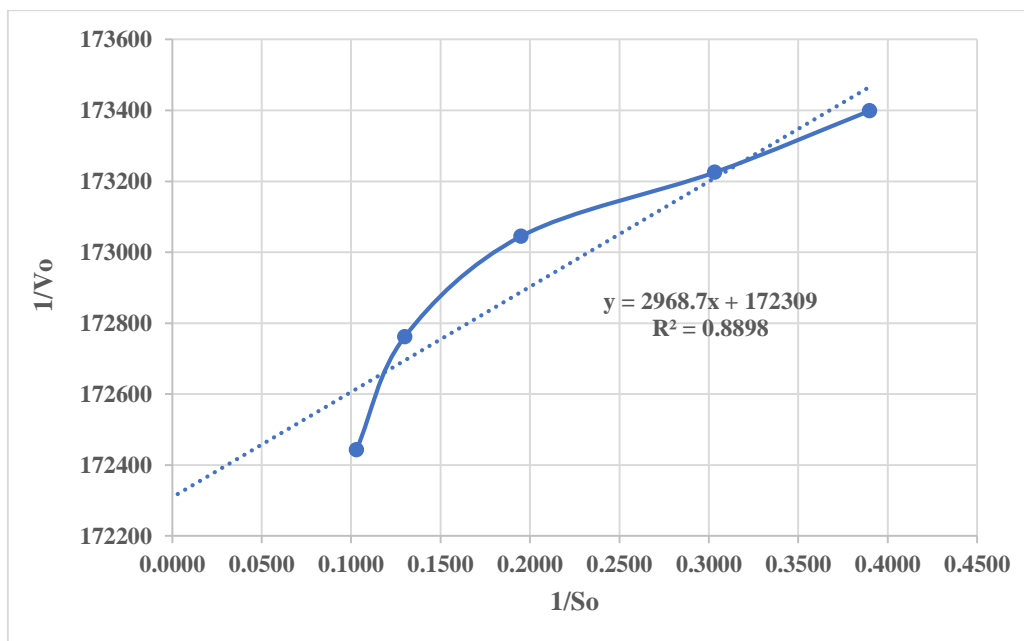


Figura 27. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “AY AMANO 30SD”

En base a la ecuación (10):

$$\frac{1}{V} = 2968.7 x \frac{1}{[S]} + 172309.00$$

$$Km = 0.0172289 \text{ g/L}$$

$$Vmáx = 0.0056695 \frac{\text{g}}{\text{L} \times \text{min}}$$

Cuadro 36: Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “A AMANO 12”

N°	So (g/L)	Emulsión (mL)		Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Densidad (g/mL)	NaOH (mL Muestra) t=15 min	NaOH (mL Blanco) t=0 min	μmol acid graso / mL muestra	g ácido/ g muestra
		Aceite (sustrato)	PVA al 2%							
1	2.5648	0.0700	0.0700	0.1400	22.3600	0.9765	1.570	1.530	0.200	0.0000038569
2	3.6640	0.1000	0.1000	0.2000	22.3000	0.9760	1.600	1.560	0.200	0.0000038589
3	5.4960	0.1500	0.1500	0.3000	22.2000	0.9747	1.610	1.570	0.200	0.0000038640
4	7.3280	0.2000	0.2000	0.4000	22.1000	0.9736	1.610	1.570	0.200	0.0000038684
5	10.9920	0.3000	0.3000	0.6000	21.9000	0.9725	1.620	1.580	0.200	0.0000038728
6	18.3200	0.5000	0.5000	1.0000	21.5000	0.9705	1.520	1.480	0.200	0.0000038807
7	25.6480	0.7000	0.7000	1.4000	21.1000	0.9687	1.520	1.480	0.200	0.0000038880
8	32.9760	0.9000	0.9000	1.8000	20.7000	0.9674	1.520	1.480	0.200	0.0000038932
9	47.6320	1.3000	1.3000	2.6000	19.9000	0.9650	1.460	1.420	0.200	0.0000039029

Cuadro 37: Inversas del sustrato vs velocidad

So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
2.5648	0.0000039	0.3899	259275.3213
3.6640	0.0000039	0.2729	259142.5638
5.4960	0.0000039	0.1820	258797.3944
7.3280	0.0000039	0.1365	258505.328
10.9920	0.0000039	0.0910	258213.2616
18.3200	0.0000039	0.0546	257682.2317
25.6480	0.0000039	0.0390	257204.3049
32.9760	0.0000039	0.0303	256859.1355
47.6320	0.0000039	0.0210	256221.8997

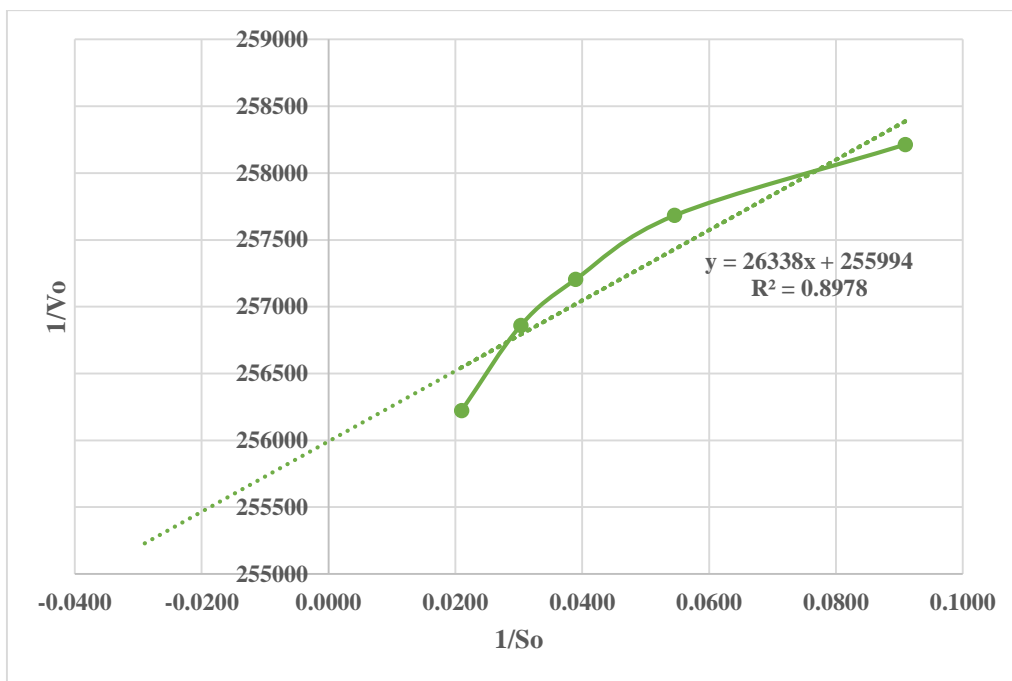


Figura 28. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “A AMANO 12”

En base a la ecuación (10):

$$\frac{1}{V} = 26338 \times \frac{1}{[S]} + 255994.00$$

$$Km = 0.1028852 \frac{g}{L}$$

$$Vmáx = 0.0037956 \frac{g}{L \times min}$$

Cuadro 38: *Estudio para la determinación de los parámetros cinéticos de la lipasa “DF AMANO 15”*

N°	Emulsión (mL)			Emulsión (mL)	Buffer (mL)	Densidad (g/mL)	NaOH (mL Muestra) t=15 min	NaOH (mL Blanco) t=0 min	μmol acid graso / mL muestra	g acido/ g muestra
	So (g/L)	Aceite (sustrato)	PVA al 2%							
1	1.7587	0.0480	0.0480	0.0960	22.4040	0.9821	1.010	0.960	0.250	0.0000047936
2	2.7846	0.0760	0.0760	0.1520	22.3480	0.9818	1.000	0.950	0.250	0.0000047951
3	5.1296	0.1400	0.1400	0.2800	22.2200	0.9814	0.990	0.940	0.250	0.0000047971
4	10.9920	0.3000	0.3000	0.6000	21.9000	0.9809	0.990	0.940	0.250	0.0000047995
5	15.5720	0.4250	0.4250	0.8500	21.6500	0.9801	0.990	0.940	0.250	0.0000048034
6	23.8160	0.6500	0.6500	1.3000	21.2000	0.9785	0.980	0.930	0.250	0.0000048113
7	28.2128	0.7700	0.7700	1.5400	20.9600	0.9776	0.980	0.930	0.250	0.0000048157
8	33.4523	0.9130	0.9130	1.8260	20.6740	0.9760	0.980	0.930	0.250	0.0000048236

Cuadro 39: *Inversas del sustrato vs velocidad*

So (g/L)	Vo (g/g)	1/So	1/Vo
1.7587	0.000004793639	0.5686	208609.7639
2.7846	0.000004795104	0.3591	208546.0403
5.1296	0.000004797059	0.1949	208461.0755
10.9920	0.000004799504	0.0910	208354.8695
15.5720	0.000004803421	0.0642	208184.94
23.8160	0.000004811276	0.0420	207845.0809
28.2128	0.000004815705	0.0354	207653.9101
33.4523	0.000004823600	0.0299	207314.051

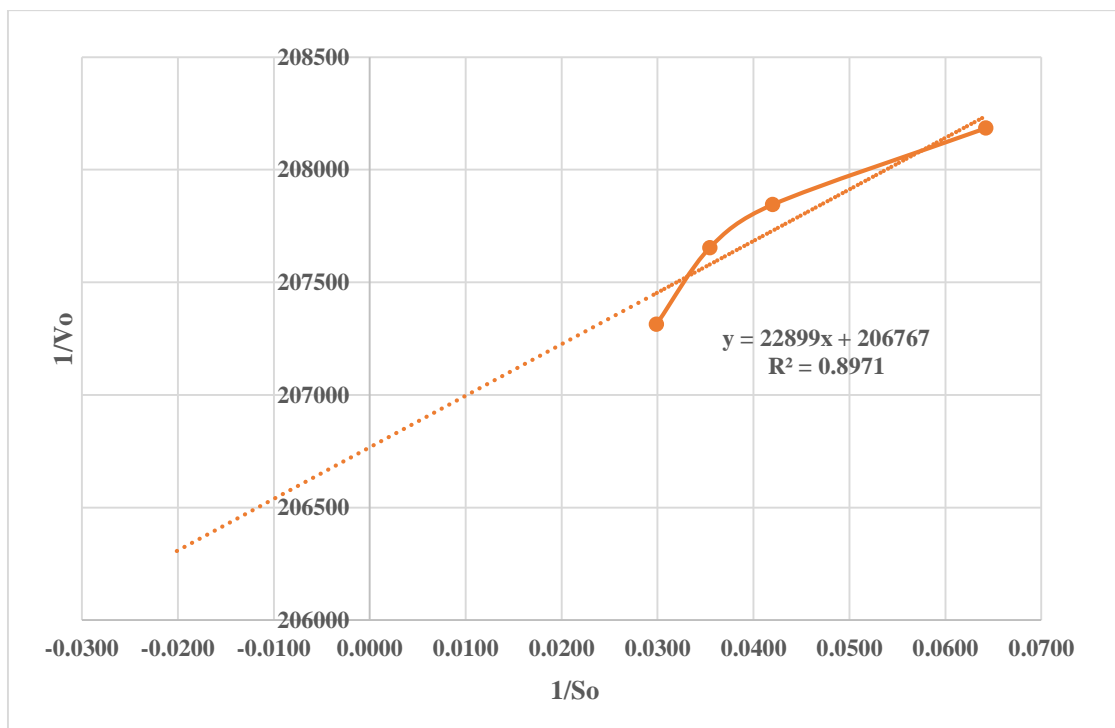


Figura 29. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la lipasa “DF AMANO 15”

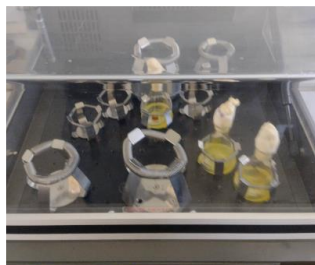
En base a la ecuación (10):

$$\frac{1}{V} = 22899 \times \frac{1}{[S]} + 206767.00$$

$$Km = 0.1107478 \frac{g}{L}$$

$$V_{m\acute{a}x} = 0.0047387 \frac{g}{L \times min}$$

Anexo 5: *Determinación del grado de hidrólisis de las diferentes concentraciones de enzimas lipasas en el aceite semi-refinado de anchoveta*



Se agregó el aceite semirrefinado de anchoveta, agua y enzima diluida en un matraz; a 160 RPM en un shaker.



Se extrajo la muestra y se inactivó.



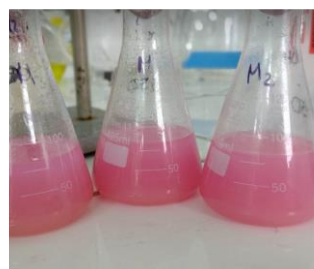
Se agregó la muestra en tubos de ensayo y se colocó en una centrifuga.



Se retiró los tubos del equipo, y se procedió a pesar cada muestra.



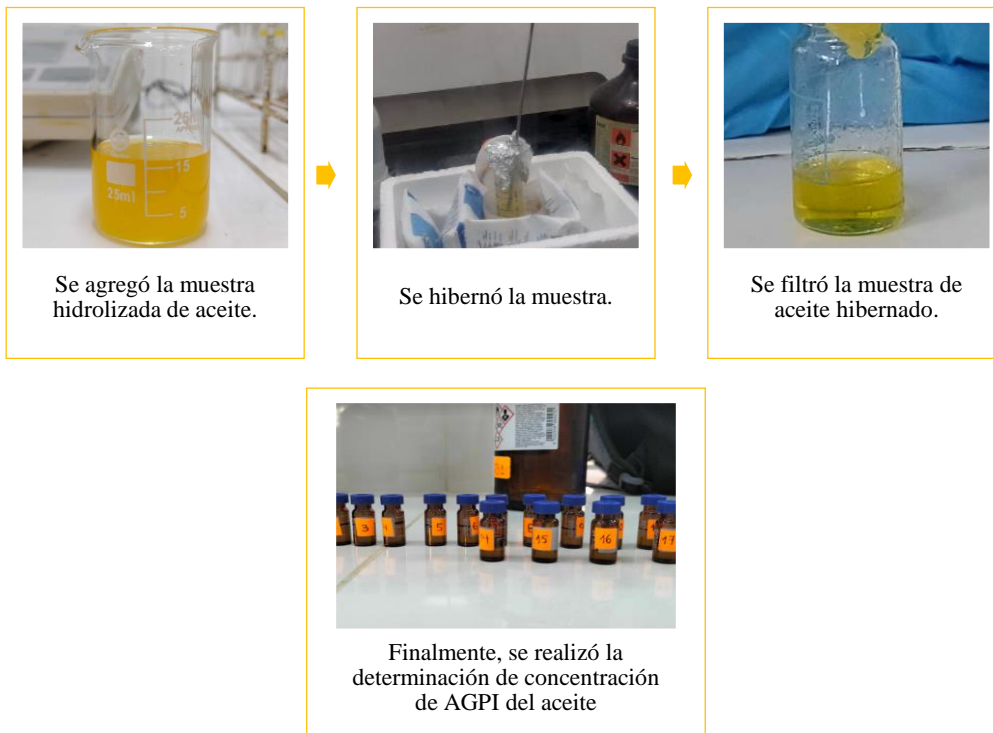
Se preparó las muestras para medir el índice de acidez.



Finalmente, se anotó el gasto para determinar el grado de hidrólisis (%GH).

Anexo 6: *Identificación y cuantificación de la concentración de AGPI de la muestra hidrolizada.*

Anexo 6A: *Proceso concentración de AGPI de la muestra hidrolizada.*



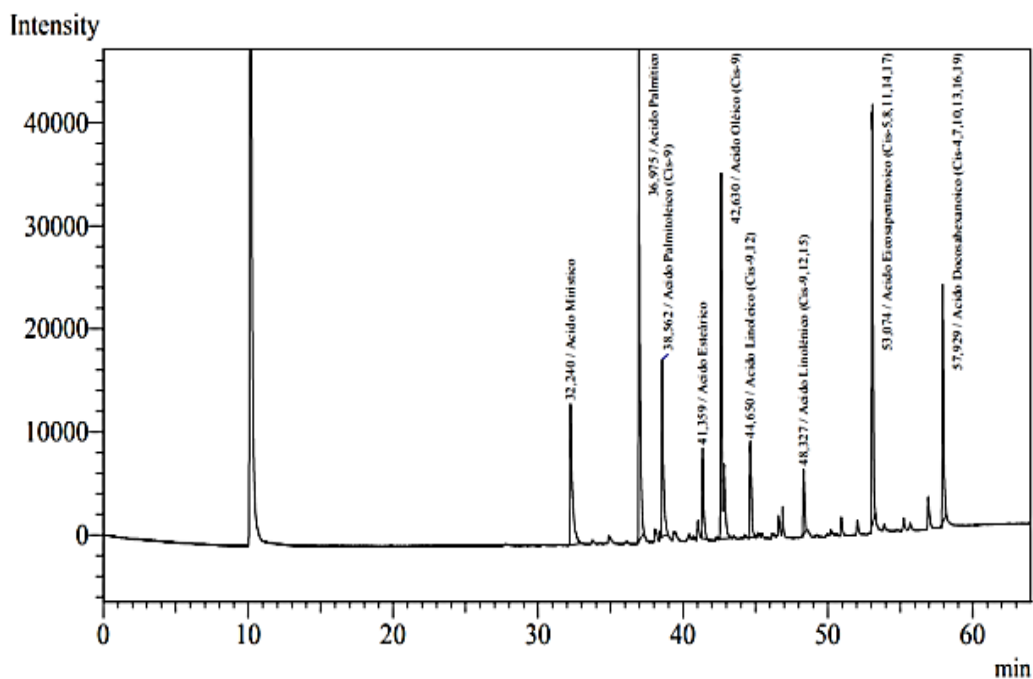
Anexo 6B: Cuantificación de ácidos grasos de los ensayos experimentales

Nomenclatura	Nombre común	Muestras (%)														
		M4 (150/30H)	M5 (300/12H)	M6 (300/48H)	M7 (450/30H)	M8 (150/12H)	M9 (450/12H)	M10 (300/30H) PC1	M11 (300/30H) PC2	M12 (300/30H) PC3	M13 (450/48H)	M14 (150/48H)	M15 (300/12H)	M16 (450/30H)	M17 (150/30H)	M18 (300/48H)
C14:0	Ácido mirístico	8.313	8.271	5.930	6.201	8.253	6.973	9.117	9.003	8.988	9.440	9.728	9.281	10.203	9.443	10.438
C16:0	Ácido palmítico	18.675	19.219	19.430	19.854	19.159	20.735	21.884	21.934	21.551	22.035	23.243	21.720	23.663	23.495	24.640
C18:0	Ácido esteárico	3.003	3.183	3.489	2.959	3.226	3.786	3.817	3.818	3.829	3.752	4.005	3.668	4.379	4.194	4.558
C20:0	Ácido araquídico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:0	Ácido behénico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C23:0	Ácido Tricosanoico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C24:0	Ácido Tetracosanoico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total AGS	29.991	30.673	28.849	29.014	30.638	31.494	34.818	34.755	34.368	35.227	36.976	34.669	38.245	37.132	39.636
C24:1	Ácido nervónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:1	Ácido erúcico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:1	Ácido gadoleico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:1 VAC	Ácido vaccénico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:1 OLE	Ácido oleico	14.101	13.866	13.925	15.012	15.142	10.582	15.153	15.527	15.351	15.661	14.663	16.394	16.221	16.761	17.122
C16:1	Ácido palmitoleico	7.611	7.626	9.309	7.753	7.908	8.952	8.462	8.409	8.139	8.741	8.938	9.503	8.242	9.044	8.872
C14:1	Ácido miristoleico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total AGM	21.712	21.492	23.234	22.765	23.050	19.534	23.615	23.936	23.490	24.402	23.601	25.897	24.463	25.805	25.994
C20:4 (n-6)	Ácido araquidónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:2 (n-6)	Ácido eicosadenoico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:2 (n-6)	Ácido linoleico	4.562	4.195	4.125	4.105	4.799	5.538	4.132	4.282	4.564	4.232	3.919	4.579	4.397	4.231	3.960
	Total AGP n-6	4.562	4.195	4.125	4.105	4.799	5.538	4.132	4.282	4.564	4.232	3.919	4.579	4.397	4.231	3.960
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- γ -linolénico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:3 (n-3)	Ácido γ -linolénico	3.457	3.230	3.271	3.295	3.764	3.764	3.204	2.796	3.695	3.002	3.353	3.344	2.622	3.077	2.933
C20:5 (n-3)	Ácido eicosapentaenoico - EPA	22.609	22.564	22.805	22.645	21.359	23.383	18.721	18.430	18.761	18.367	18.229	18.210	17.382	17.033	15.856
C22:6 (n-3)	Ácido docosahexaenoico - DHA	17.668	17.847	17.716	18.176	16.389	16.287	15.509	15.800	15.119	14.771	13.921	13.299	12.890	12.721	11.622
	Total AGP n-3	43.734	43.641	43.792	44.116	41.512	43.434	37.434	37.026	37.575	36.140	35.503	34.853	32.894	32.831	30.411

Anexo 6C: Reporte del análisis cromatográfico de ácidos grasos de la muestra de aceite inicial

Analysis Date & Time : 04/09/2023 11:55:57
 User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : M1
 Sample ID : M1
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1,00
 ISTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\FAMES\aceite de pescado 31-08-23\Muestra1.gcd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\FAMES\Metodo FAMES AOAC 991.39 (Rt-2560).gcm

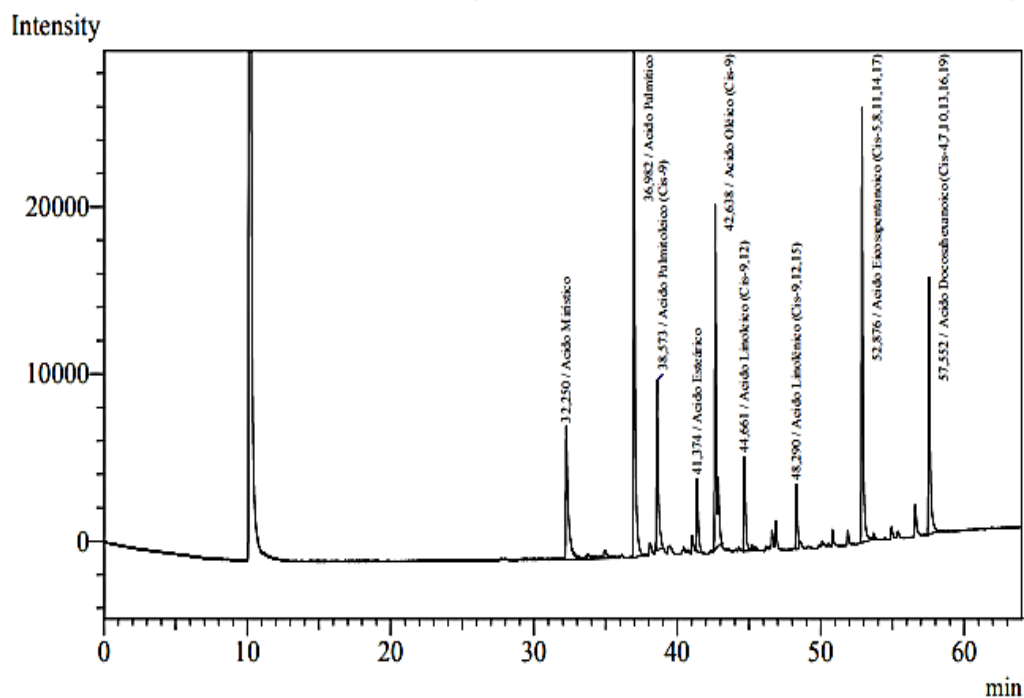


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	ID#	Cmpd Name
1	32,240	145967	13661	8,621	%	8	Acido Mirístico
2	36,975	345498	58202	19,428	%	11	Acido Palmítico
3	38,562	132655	17155	7,681	%	12	Acido Palmitoleico (Cis-9)
4	41,359	62166	8703	3,445	%	14	Acido Estearico
5	42,630	273012	35206	15,021	%	16	Acido Oléico (Cis-9)
6	44,650	71024	9300	4,464	%	18	Acido Linoleico (Cis-9,12)
7	48,327	42440	6332	3,037	%	21	Acido Linolénico (Cis-9,12,15)
8	53,074	240192	40526	21,660	%	26	Acido Eicosapentanoico (Cis-5,8,11,14,17)
9	57,929	158020	23094	16,642	%	28	Acido Docosahexanoico (Cis-4,7,10,13,16,19)
Total		1470974	212179				

Anexo 6D: Reporte del análisis cromatográfico de ácidos grasos de la muestra de aceite concentrado.

Analysis Date & Time : 05/09/2023 13:59:44
 User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : M2
 Sample ID : M2
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1,00
 ISTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\FAMES\aceite de pescado 31-08-23\M2.gcd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\FAMES\Metodo FAMES AOAC 991.39 (Rt-2560).gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	ID#	Cmpd Name
1	32,250	96845	8012	8,386	%	8	Acido Mirístico
2	36,982	213854	31408	17,631	%	11	Acido Palmítico
3	38,573	85499	10161	7,258	%	12	Acido Palmitoleico (Cis-9)
4	41,374	34018	4339	2,764	%	14	Acido Estearico
5	42,638	161997	20636	13,068	%	16	Acido Oléico (Cis-9)
6	44,661	51393	5653	4,736	%	18	Acido Linoleico (Cis-9,12)
7	48,290	31433	3889	3,297	%	21	Acido Linolénico (Cis-9,12,15)
8	52,876	181500	25983	23,997	%	26	Acido Eicosapentanoico (Cis-5,8,11,14,17)
9	57,552	122151	15354	18,861	%	28	Acido Docosahexanoico (Cis-4,7,10,13,16,19)
Total		978690	125435				