

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**Programa de Doctorado en Ingeniería en Alimentos**



**UNS**  
**ESCUELA DE**  
**POSGRADO**

---

---

**Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de  
anchoveta (*Engraulis ringens*) en las propiedades funcionales  
de un extruido de arroz (*Oryza sativa*).**

---

---

**Tesis para optar el grado académico de  
Doctor en Ingeniería en alimentos**

**Autor:**

**Mg. Espinoza Mendoza, Deyvis Jonathan**

**Asesor:**

**Dr. Castillo Calderón, Augusto**  
**DNI. N° 32931123**  
**Código ORCID: 0000-0001-9237-8542**

**Línea de investigación**  
**Estudio y diseño de productos de**  
**mayor calidad y aceptación**

**Nuevo Chimbote - PERÚ**  
**2023**

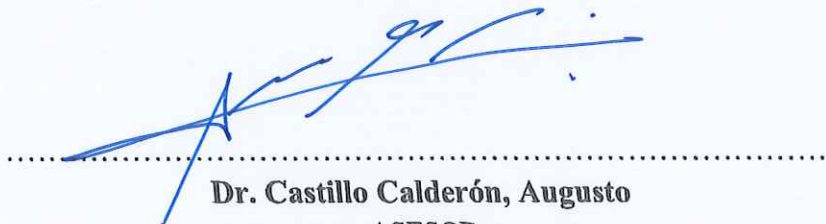


**UNS**  
ESCUELA DE  
POSGRADO

## CERTIFICACIÓN DE ASESORAMIENTO DE LA TESIS

YO, **Dr. Castillo Calderón, Augusto**, por medio de la presente certifico mi asesoramiento de la Tesis titulada: **"Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anchoveta (*Engraulis ringens*) en las propiedades funcionales de un extruido de arroz (*Oryza sativa*)"** que tiene como autor al **Mg. Espinoza Mendoza, Deyvis Jonathan**, alumno del Doctorado en **Ingeniería en alimentos** ha sido elaborado de acuerdo al Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa.

Nuevo Chimbote, diciembre, del 2023



**Dr. Castillo Calderón, Augusto**

ASESOR

Código. ORCID: 0000-0001-9237-8542

DNI N°: 32931123



**UNS**  
ESCUELA DE  
POSGRADO

### CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

**"Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anchoveta (*Engraulis ringens*) en las propiedades funcionales de un extruido de arroz (*Oryza sativa*)".**

**Tesis para Optar el grado de Doctor en Ingeniería en Alimentos**

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....  
**Dr. Domínguez Castañeda, Jorge Marino**  
Presidente

Código. ORCID: 0000-0003-0488-5726

DNI N°: 32975182

.....  
**Dra. Aguirre Vargas, Elza Berta**  
Secretaria

CODIGO ORCID: 0000-0003-1659-9874

DNI N° 19096335

.....  
**Dr. Castillo Calderón, Augusto**  
Vocal

CODIGO ORCID: 0000-0001-9237-8542

DNI N° 32931123



**UNS**  
ESCUELA DE  
POSGRADO

### ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

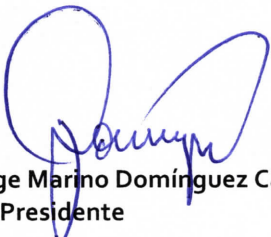
A los diecinueve días del mes de diciembre del año 2023, siendo las 10.00 horas, en el aula P-02 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador, designados mediante Resolución Directoral N° 316-2023-EPG-UNS de fecha 16.11.2023, conformado por los docentes: Dr. Jorge Marino Domínguez Castañeda (Presidente), Dra. Elza Berta Aguirre Vargas (Secretaria) y Dr. Augusto Castillo Calderón (Vocal); con la finalidad de evaluar la tesis titulada: **EFFECTO DE LA OPTIMIZACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE ANCHOVETA (ENGRAULIS RINGENS) EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE UN EXTRUIDO DE ARROZ (ORYZA SATIVA)**; presentado por el tesista **Deyvis Jonathan Espinoza Mendoza**, egresado del programa de **Doctorado en Ingeniería de Alimentos**.

Sustentación autorizada mediante Resolución Directoral N° 338-2023-EPG-UNS de fecha 13 de diciembre de 2023.

El presidente del jurado autorizó el inicio del acto académico; producido y concluido el acto de sustentación de tesis, los miembros del jurado procedieron a la evaluación respectiva, haciendo una serie de preguntas y recomendaciones a la tesista, quien dio respuestas a las interrogantes y observaciones.

El jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como APROBADO, asignándole la calificación de DIECIOCHO (18).

Siendo las 12.20 horas del mismo día se da por finalizado el acto académico, firmando la presente acta en señal de conformidad.

  
Dr. Jorge Marino Domínguez Castañeda  
Presidente

  
Dra. Elza Berta Aguirre Vargas  
Secretaria

  
Dr. Augusto Castillo Calderón  
Vocal - Asesor

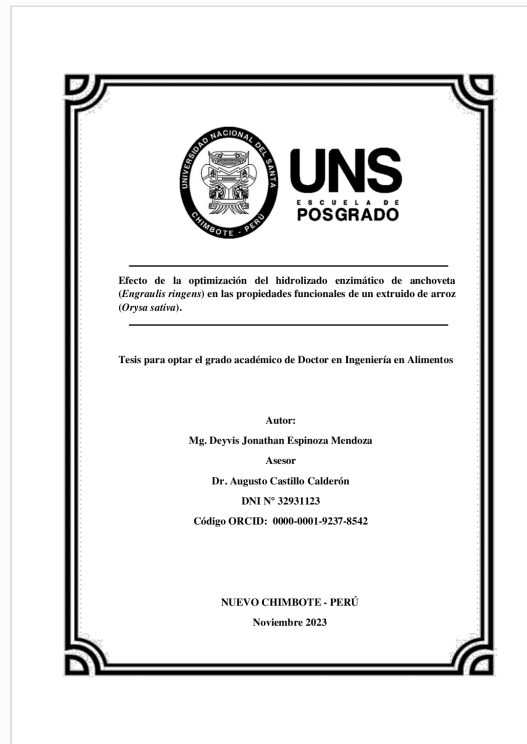


## Recibo digital

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:	DEYVIS JONATHAN ESPINOZA MENDOZA
Título del ejercicio:	Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anc...
Título de la entrega:	Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anc...
Nombre del archivo:	TESIS_30-12-2023_vf.pdf
Tamaño del archivo:	4.78M
Total páginas:	143
Total de palabras:	32,815
Total de caracteres:	180,894
Fecha de entrega:	02-ene.-2024 06:36p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre...	2266262682



# Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anchoveta (*Engraulis ringens*) en las propiedades funcionales de un extruido de arroz (*Oryza sativa*).

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

20%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

## ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

---

8%

★ hdl.handle.net

Fuente de Internet

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo

## **DEDICATORIA**

A Dios, por brindarme la oportunidad de ser parte de este mundo, otorgándome el tiempo correcto y el lugar adecuado para aportar un granito de arena.

A mis padres Máximo y Yolanda, por su apoyo, esfuerzo y sus enseñanzas para valorar el amor de los padres a sus hijos y el orgullo de verlos crecer por sus propios medios.

A mis hijas y a mi esposa por su amor y comprensión, por apoyarme en cada momento y brindarme la fortaleza necesaria para seguir a delante ante cada adversidad.

A mis seres queridos, por sus consejos, apoyo, paciencia y toda la ayuda que me brindan siempre y desean verme crecer cada día.

## **AGRADECIMIENTO**

A los docentes de la Escuela de Postgrado, Programa Doctoral en Ingeniería en Alimentos de la Universidad Nacional del Santa, por los conocimientos brindados.

A Milos, Gabriel y equipo de Colpex International S.A. por el apoyo en la realización de la fase 1 de presente investigación.

A Edith y equipo de Industrias Proalimentos S.A.C. por el apoyo en la realización de la fase 2 de la presente investigación.

Al Dr. Augusto Castillo, por sus conocimientos y brindarme la asesoría profesional en esta investigación.

Un agradecimiento especial a Marco Medina y a toda mi familia y amigos que apoyaron de manera directa e indirecta para poder culminar la presente investigación.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	20
1.2.1. Problema general .....	20
1.2.2. Problemas específicos.....	20
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	21
1.3.1. Objetivo general .....	21
1.3.2. Objetivos específicos .....	21
1.4. HIPÓTESIS CENTRAL DE LA INVESTIGACIÓN .....	22
1.5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	22
II. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1. ANTECEDENTES .....	24
2.2. MARCO CONCEPTUAL .....	29
2.2.1. Arroz.....	29
2.2.2. Composición química y nutricional del arroz.....	31
2.2.3. Producción del arroz .....	32
2.2.4. Variedades de arroz en el Perú .....	34
2.2.5. Subproductos de producción de arroz .....	34
2.2.6. Anchoveta Peruana .....	36
2.2.7. Hidrolisis Enzimática de proteínas .....	38
2.2.8. Grado de hidrolisis.....	41
2.2.9. Proteasas .....	42
2.2.10. Clasificación de las Proteasas.....	43
2.2.11. Proteasas comerciales .....	43
2.2.12. Aplicación de los hidrolizados de pescado en la industria alimentaria. ....	44
2.2.13. Extrusión de alimentos .....	46
2.2.14. Producción de granos fortificados .....	47
2.2.15. Fortificación del arroz .....	48

2.2.16.	Grano fortificado (grano símil).....	49
2.2.17.	Implementación de procesos y equipos para producción de granos fortificados . 50	
2.2.18.	Proceso de extrusión de granos fortificados (grano símil de arroz) .....	50
2.2.19.	Proceso de extrusión en tibio.....	51
2.2.20.	Parámetros operacionales de extrusión de granos fortificados.....	53
2.2.21.	Calidad de los granos fortificados .....	54
2.2.22.	Arroz Fortificado. ....	55
2.2.23.	Precio de mercado del Arroz Fortificado. ....	56
2.2.24.	La malnutrición.....	56
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1.	Diseño experimental .....	57
3.2.	Variables e indicadores de la investigación .....	57
3.3.	Materia prima e insumos utilizados .....	64
3.4.	Proceso de hidrólisis enzimática .....	66
3.5.	Proceso de extrusión .....	67
3.6.	Métodos analíticos .....	68
3.7.	Análisis Estadístico.....	74
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
4.1.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA FASE 1 DE LA INVESTIGACIÓN ...</b>	<b>75</b>
4.1.1.	Caracterización fisicoquímica de la materia prima .....	75
4.1.2.	Determinación de la actividad enzimática.....	76
4.1.3.	Hidrólisis enzimática de Anchoveta .....	79
4.1.4.	Optimización de las variables independientes sobre los grados Brix referenciales (°Bx Ref), porcentaje de sólidos insolubles (% SI) y porcentaje de grasa (% G). .....	80
4.1.5.	Valores óptimos para la obtención de 8°Brix referencial (Bx ref.), minimizando el porcentaje de sólidos insolubles(%SI) y grasa(%G) en la reacción enzimática .....	83
4.1.6.	Validación de condiciones óptimas .....	87
4.2.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA FASE 2 DE LA INVESTIGACIÓN ...</b>	<b>90</b>
4.2.1.	Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la materia prima e insumos para la elaboración del grano símil de arroz.....	90
4.2.2.	Efecto de las variables independientes (Concentrado proteico y Aditivo) sobre las variables respuesta; Contenido proteico (%P), Porcentaje de pérdida por cocción (%PC) y Grado de similitud respecto al grano de arroz (°S). ....	94

4.2.3.	Maximización de contenido proteico (%P), minimización de pérdidas por cocción (%PC) y mayor similitud del grano símil de arroz (°S). .....	97
4.2.4.	Validación de condiciones óptimas .....	99
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	106
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	108
VII.	ANEXOS.....	120

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis proximal (g/100g) de arroz crudo y cocido.....	32
Tabla 2. Perfil de Aminoácidos de arroz integral y blanco .....	32
Tabla 3. Estimado de producción de arroz pilado por campaña en el mundo en los últimos 6 años (millones de toneladas).....	33
Tabla 4. Producción de arroz con cascara según región natural 2017-2023 (toneladas) ....	34
Tabla 5. Composición química y nutricional de la anchoveta.....	37
Tabla 6. Perfil de aminoácidos del músculo de anchoveta.....	38
Tabla 7. Características de las proteasas comerciales .....	43
Tabla 8. Productos comerciales de péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas de pescado .....	45
Tabla 9. Contenido de micronutrientes que debe tener un grano símil fortificado .....	49
Tabla 10. Parámetros operacionales de la extrusión de grano fortificados .....	53
Tabla 11. Requisitos de calidad de un grano fortificado .....	54
Tabla 12. Comparativo de precios del arroz y arroz fortificado en el 2022 y 2023. ....	56
Tabla 13. Niveles de estudio para los experimentos de Hidrólisis Enzimática de Anchoveta .....	58
Tabla 14. Diseño experimental factorial Modelo de Box-Behnken para los ensayos experimentales de hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana. ....	59
Tabla 15. Concentración de enzima utilizada para cada tratamiento .....	60
Tabla 16. Niveles de estudio para los experimentos de formulación del extruido (grano símil de arroz).....	62
Tabla 17. Diseño experimental factorial 2 <sup>k</sup> para los ensayos experimentales para los experimentos de formulación del extruido (grano símil de arroz). ....	63
Tabla 18. Datos de fichas técnicas de proteasas comerciales. ....	65
Tabla 19. Criterios microbiológicos considerados para evaluación de vida útil del grano símil enriquecido con péptidos de anchoveta .....	73
Tabla 20. Composición proximal de anchoveta entera.....	75
Tabla 21. Actividad enzimática (U*/ml) de las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 a pH=6.2 y a la temperatura de 60°C .....	77
Tabla 22. Resultados experimentales del modelo factorial Box-Benhken para la hidrólisis enzimática de Anchoveta.....	79
Tabla 23. Análisis de varianza para Bx ref., %SI y %G.....	82
Tabla 24. Condiciones óptimas de hidrólisis enzimática de Anchoveta entera para la validación experimental.....	88

Tabla 25.	Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la hidrólisis de Anchoveta para la producción de péptidos solubles.....	88
Tabla 26.	Composición fisicoquímica del Hidrolizado líquido de Anchoveta entera aplicando los parámetros optimizados para la obtención de 8°Bx ref., minimizando sólidos insolubles y grasa. ....	88
Tabla 27.	Composición físico química del concentrado proteico hidrolizado en polvo ..	91
Tabla 28.	Análisis de metales pesados y micronutrientes presentes en el concentrado proteico hidrolizado en polvo .....	91
Tabla 29.	Perfil de Aminoácidos presentes en el del concentrado proteico hidrolizado en polvo .....	92
Tabla 30.	Análisis microbiológico del concentrado proteico hidrolizado .....	93
Tabla 31.	Resultados experimentales del modelo factorial 2 <sup>k</sup> la sustitución parcial de la harina de arrocillo. ....	94
Tabla 32.	Análisis de varianza para %P %PC y °S .....	96
Tabla 33.	Formulación empleada para la validación experimental del perfil de optimización del %CP y %A .....	100
Tabla 34.	Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la formulación del extruido (grano símil de arroz) .....	100
Tabla 35.	Composición proximal del grano símil de arroz enriquecido con péptidos de anchoveta, obtenido utilizando formulación optimizada.....	101
Tabla 36.	Procedimiento del ensayo de cuantificación de actividad enzimática proteasa. ....	123
Tabla 37.	Preparación de la curva de calibración de tirosina .....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de grano de arroz.....	30
Figura 2.	Subproductos del proceso de pilado de arroz .....	35
Figura 3.	Tipos de arroz partido.....	35
Figura 4.	Anchoveta ( <i>Engrulis ringens</i> ).....	36
Figura 5.	Clasificación de las proteasas .....	42
Figura 6.	Proceso de producción de granos fortificados .....	51
Figura 7.	Esquema de una extrusora con sus componentes básicos .....	52
Figura 8.	Esquema del proceso de extrusión en tibio .....	53
Figura 9.	Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la fase 1 de la investigación .	61
Figura 10.	Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la fase 2 de la investigación .	64
Figura 11.	Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para 8 °Bx ref. A). Interacción sustrato enzima. B) Interacción Tiempo de reacción enzima. C) Interacción Tiempo de reacción sustrato. ....	85
Figura 12.	Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para 8 °Bx ref., minimizando el porcentaje de sólidos insolubles y grasa A). Interacción sustrato enzima. B) Interacción Tiempo de reacción enzima. C) Interacción Tiempo de reacción sustrato.....	87
Figura 13.	Concentrado Proteico Hidrolizado de Anchoveta entera en polvo obtenido con los parámetros de proceso optimizados en la fase 1. ....	93
Figura 14.	Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para maximizar el %P y °S, minimizando el % PC A). Interacción aditivo sustrato para el %P. B) Interacción aditivo sustrato para el %PC. C) Interacción aditivo sustrato para el °S.....	99
Figura 15.	Grano símil obtenido con de formulación optima a escala industrial .....	105
Figura 16.	Flujo del proceso productivo del concentrado proteico hidrolizado de pescado en polvo implementado por Colpex International S.A.C. ....	121
Figura 17.	Preparación de la curva de calibración .....	124
Figura 18.	Curva de calibración de Tirosina.....	125
Figura 19.	Flujo del proceso productivo del grano símil de arroz implementado por Industrias Proalimentos S.A.C.....	129
Figura 20.	Informe de ensayo N°AG-238487-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-Resultados de análisis proximal de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta .....	130
Figura 21.	Informe de ensayo N°AG-237850-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-Resultados de análisis de metales pesados del Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta .....	131
Figura 22.	Informe de ensayo N°AG-238333-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-Resultados de análisis microbiológico de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta .....	132

Figura 23. Informe de ensayo N°AG-238795-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-Resultados de Fluor de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta .....	133
Figura 24. Resultados de análisis de perfil de Aminoácidos y micronutrientes de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta reportados por el Laboratorio de Calidad de Colpex International S.A.C.....	134
Figura 25. Informe de ensayo N°255-2023/N-Laboratorio Certipez E.I.R.L- Resultados de análisis de contenido de proteína del Grano símil de arroz obtenido. ....	135
Figura 26. Escala de intervalo para determinar grado de similitud.....	136
Figura 27. Hidrolizado líquido de anchoveta. Separación de fases mediante centrifugación	138
Figura 28. Reactores de la planta de COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.....	138
Figura 29. Desarrollo de prueba en las instalaciones de INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC .....	139
Figura 30. Tamaño y forma de los granos de arroz y grano símil evaluados .....	139
Figura 31. Comparación de forma de grano de pilado e integral respecto al grano símil comercial y el obtenido en presente estudio. ....	140
Figura 32. Prueba de preparación culinaria.....	141

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Fichas Técnicas de proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 .....	120
ANEXO N° 2 Flujo del proceso productivo del concentrado proteico hidrolizado de anchoveta, en polvo. ....	121
ANEXO N° 3 Cuantificación de actividad enzimática usando caseína como sustrato (Cupp-Enyard, 2008) .....	122
ANEXO N° 4 Metodología para determinar grado de hidrolisis.....	126
ANEXO N° 5 Metodología para estimar perdida por cocción .....	128
ANEXO N° 6 Flujo del proceso productivo del grano símil de arroz. ....	129
ANEXO N° 7 Análisis del Concentrado proteico hidrolizado de anchoveta en polvo obtenido. ....	130
ANEXO N° 8 Análisis del Contenido proteico del grano símil de arroz obtenido .....	135
ANEXO N° 9 Metodología para determinar el grado de similitud .....	136
ANEXO N° 10 Estudio de vida útil.....	137
ANEXO N°11 Imágenes del Estudio. ....	138
ANEXO N°12 Constancia de uso de instalaciones de Colpex International S.A.C.....	142
ANEXO N°13 Constancia de uso de instalaciones de Industrias Proalimentos S.A.C.....	143

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue brindar valor agregado a la proteína de anchoveta (*Engraulis ringens*) y al arrocillo (*Oryza sativa*), mediante la optimización de la producción de péptidos solubles de anchoveta por acción enzimática de las proteínas comerciales y su posterior aplicación en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión, para la fortificación del arroz pilado de consumo masivo. El presente estudio reportó que las condiciones óptimas para la hidrólisis de anchoveta peruana entera mediante el uso combinado de las enzimas comerciales Corolase 7089 + Corolase 8000 fueron de un 0.36g / 100g sustrato (0.085g + 0.275g respectivamente de cada enzima), 0.45% de sustrato por tiempo de reacción de 31.87 min, obteniendo 7.91 °Brix referencial (equivalente ~14.03% de grado de hidrolisis), 33.8% de Sólidos insolubles y 2.32% de grasa. El concentrado proteico hidrolizado en polvo obtenido con estos parámetros de hidrolisis fue utilizado como insumo para la sustitución parcial de la harina de arrocillo en la formulación de un extruido (grano símil de arroz), optimizando la formulación mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), se determinó una formulación óptima con un 16.19% concentrado proteico hidrolizado, 0.19% de aditivo y un 83.64% de harina de arrocillo obteniendo 18.77% de Contenido proteico, 8.22% de Perdida por cocción y 6.12 de grado de similitud respecto al grano de arroz. Estos resultados demuestran que el grano símil de arroz obtenido por extrusión a base de harina de arrocillo y concentrado proteico hidrolizado de anchoveta, es una alternativa viable para la fortificación del arroz pilado, incorporando proteína y micronutrientes provenientes de anchoveta en la dieta diaria con valores superiores a los alimentos de consumo masivo como leche evaporada entera, huevo sancochado o queso fresco de vaca, entre otros, a un menor costo, sin modificar los hábitos alimenticios.

**Palabras clave:** Hidrolisis, Corolase 8000, Corolase 7089, concentrado proteico de anchoveta, grano similitud de arroz, extruido, fortificación.



## ABSTRACT

The objective of the study was to provide added value to anchovy (*Engraulis ringens*) and rice (*Oryza sativa*) protein, by optimizing the production of soluble anchovy peptides by enzymatic action of commercial proteins and their subsequent application in the formulation of a grain similar to rice obtained by extrusion, for the fortification of piled rice for mass consumption. The present study reported that the optimal conditions for the hydrolysis of whole Peruvian anchovy through the combined use of the commercial enzymes Corolase 7089 + Corolase 8000 were 0.36g / 100g substrate (0.085g + 0.275g respectively of each enzyme), 0.45% of substrate for a reaction time of 31.87 min, obtaining a reference 7.91 °Brix (equivalent to ~20.03% degree of hydrolysis), 33.8% insoluble solids and 2.32% fat. The hydrolyzed protein concentrate in powder obtained with these hydrolysis parameters was used as an input for the partial replacement of rice flour in the formulation of an extrudate (rice-like grain), optimizing the formulation using Response Surface Methodology (RSM). , an optimal formulation was determined with 16.19% hydrolyzed protein concentrate, 0.19% additive and 83.64% rice flour, obtaining 18.77% protein content, 8.22% loss during cooking and 6.12 degree of similarity with respect to the rice grain.

These results demonstrate that the similar rice grain obtained by extrusion based on rice flour and hydrolyzed anchovy protein concentrate is a viable alternative for the fortification of piled rice, incorporating protein and micronutrients from anchovy in the daily diet with higher values. to mass consumption foods such as whole evaporated milk, boiled eggs or fresh cow's cheese, among others, at a lower cost, without modifying eating habits.

Keywords: Hydrolysis, Corolase 8000, Corolase 7089, anchovy protein concentrate, rice-like grain, extruded, fortification.

## I. INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los insumos del cual depende la alimentación de más de la mitad de la población mundial, y su cultivo es, por lo tanto, uno de los más importantes en el planeta. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el consumo medio de arroz en los últimos años, fue de 85 kg por persona en Asia y de unos 6 kg en Europa (DFGrupo, 2023). En el Perú el volumen de consumo de arroz pilado por persona se ha incrementado año tras año, hasta alcanzar un volumen aproximado de 61 kg, el más alto entre los países de América Latina (Muthayya et al, 2014; Agencia Agraria Noticias, 2022)

Si bien el arroz es un alimento de consumo masivo en el país, este no proporciona todos los nutrientes necesarios para una nutrición adecuada. Este alimento contiene proporciones bajas de proteínas (~2.4 % arroz pilado y ~7.8 % arroz blanco corriente) (Reyes-García et al., 2017), y entre otros nutrientes, y en comparación con los demás cereales el arroz es deficiente en lisina y triptófano comparado con otros cereales (Kawakatsu, 2019). Por este motivo, se sugiere que su consumo sea complementado con proteínas, principalmente de origen animal como el pescado, para equilibrar la nutrición (Rohman et al., 2014)

En este contexto, la producción mundial de pescado aumentó un 1,2 % en 2022 llegando a los 184,1 millones de toneladas (INFOPECSA, 2023). En el Perú la especie de mayor captura es la anchoveta. Sin embargo, el 98.12% es destinado al consumo humano indirecto y solo el 1.88% para el consumo humano directo, del cual el 0.13% corresponde al consumo en fresco (PRODUCE, 2023). Su sabor distintivo y fuerte la hace relativamente poco atractiva, y por ello tiende a ser consumida en pequeñas cantidades a pesar de su promoción (IFFO, 2020). A pesar de esto, la amplia disponibilidad de este recurso en el país y sus características nutricionales excepcionales representan un gran potencial para la elaboración de hidrolizados de proteínas de pescado. Estos productos tienen una gran importancia dadas sus

propiedades nutricionales, su valor proteico y sus propiedades funcionales y bioactivas, las cuales derivan de los péptidos de bajo peso molecular formados durante la hidrólisis (Abuine et al. 2019).

Los hidrolizados de pescado se vienen utilizando para suplementar productos de alta disponibilidad para mitigar, entre otros problemas, los desafíos de la nutrición humana (Clemente, 2000; Neklyudov, 2000; Chalamaiah et al., 2012; Benjakul et al., 2014). Varias investigaciones han reportado la mejora nutricional de los productos suplementados con hidrolizados de pescado (Egerton et al., 2018; Rivero-Pino et al., 2020; Lima et al., 2021). Sin embargo, si bien el aporte nutricional es alcanzado cuando un producto alimenticio se enriquece con hidrolizados proteicos, otros aspectos (del procesamiento u organolépticos) tienen que ser investigados, como el porcentaje de pérdida por cocción, grado de similitud del producto, sabor, textura, forma, tiempo de vida útil, entre otros, que finalmente van a darle valor y aceptabilidad al producto final.

Por lo antes expuesto, esta investigación tuvo por objetivo obtener un extruido (grano similar de arroz) elaborado a base de harina de un subproducto de arroz (arrocillo), enriquecido con péptidos solubles de anchoveta (*Engraulis ringens*) obtenidos por acción enzimática con características de calidad (contenido proteico, grado de similitud al grano de arroz y pérdida por cocción) aceptables para su viabilidad como fortificante del arroz de consumo masivo.

### **1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

La FAO (2022), en su informe titulado “El estado de la seguridad alimentaria y nutrición en el mundo”, presentó la situación a nivel mundial sobre la seguridad alimentaria y la nutrición, así mismo, los costos y asequibilidad de comidas saludables. En las cifras que menciona esta organización, se halló que 828 millones de personas han sufrido hambre el 2021, 46 millones de personas más que el año 2020 y 150 millones más que el 2019.

Aproximadamente, 2300 millones de personas (29,3 %), en todo el mundo, se vieron afectadas por la inseguridad alimentaria moderada o grave el 2021, un aumento de 350 millones más que antes del inicio de la pandemia de la COVID-19. Aproximadamente, 924 millones de personas (11,7 % de la población mundial) sufren de inseguridad alimentaria grave, es decir, hubo un aumento de 207 millones en dos años.

La inseguridad alimentaria conlleva a problemas complejos como la desnutrición, que particularmente son perjudiciales para los niños, haciéndolos más susceptibles a las infecciones y, en última instancia, pueden provocar discapacidad física y deterioro cognitivo. La desnutrición crónica puede provocar retraso del crecimiento (baja altura para la edad) y emaciación (bajo peso para la altura). En el Perú, el Instituto Nacional de Estadística e Informática -INEI (2018), realizó la encuesta Demográfica y de Salud Familiar, en el cual señala que la prevalencia de anemia en niños de 6 a 35 meses es de 43,5 % a nivel nacional. Según el área de residencia, la anemia en la zona rural alcanza un 50,9 %, y en el área urbana alcanzó el 40,9 %. Asimismo, en la encuesta se registró un 12,2 % de desnutrición crónica en niños menores de 5 años, siendo de 7,3 % en ámbitos urbanos y de 25,7 % en ámbitos rurales, lo que constituye un problema relevante por solucionar en el país.

En este contexto, la obtención de ingredientes nutritivos incluidos en alimentos ‘vehículo’ de amplia disponibilidad que puedan proveer de propiedades alimentarias necesarios en la dieta de la población peruana, sin modificar sus hábitos alimenticios, podría ser un medio por el cual adquirir nutrientes, principalmente proteínas de alta calidad, que ayuden a disminuir los niveles de desnutrición en la población.

Uno de los cereales de grano de amplio alcance en la población peruana es el arroz. Sin embargo, está sujeto a diferentes etapas durante su procesamiento, obteniendo un producto altamente refinado, que, desde el punto de vista nutricional, pierde diversos

elementos importantes como el germen, las capas externas, vitaminas, proteínas y minerales (FAO, 2002).

Por otra parte, existen diversos productos derivados de la anchoveta, entre ellos, productos frescos, congelados, enlatados y curados, algunos producidos a partir de anchoveta, los cuales no han llegado a lograr el alcance hacia la población. Los principales obstáculos para lograr este objetivo es la carencia de una red de frío al interior del país, la ausencia de una red vial adecuada, colisión con hábitos de consumo locales y la manipulación de los productos que producen daño a las características organolépticas del pescado, por lo tanto, es poco aceptado por la población. Estas razones dificultan el aprovechamiento del recurso como fuente rica de proteínas en la dieta de la población peruana. Es por eso que resulta prioritario definir alternativas que permitan aprovechar el valor nutricional de la anchoveta, principalmente como fuente de proteínas para el consumo humano (SNP, 2016).

En ese contexto, con el fin de facilitar a los diferentes sectores de la población el acceso a alimentos enriquecidos, se busca identificar soluciones tecnológicas para superar los problemas del procesamiento de la anchoveta que permitan aprovechar el potencial del recurso como fortificante de alimentos, como el arroz, para el consumo humano directo (SNP, 2016).

La ventaja de la fortificación de alimentos es que no requiere cambiar los patrones de consumo porque se elige para la fortificación un alimento de alto consumo, y el arroz reúne estas características. La otra condición es que dicho alimento no cambie sus características organolépticas con la fortificación (CENAN, 2020). Actualmente las alternativas normalizada de fortificación se limitan únicamente a vitaminas y minerales de procedencia importada, tal es el caso del grano sémil de arroz requerido para la fortificación

del arroz, de acuerdo con los requisitos establecidos en Resolución Ministerial N° 564-2022-MINSA y la fortificación de la Sal (Decreto Ley N° 17387, 1969; Decreto Supremo N° 015-84-SA, 1984) y Harina de trigo y derivados (Ley N°28314, 2004). No existe a la fecha disposiciones relacionadas a la fortificación con péptidos o aminoácidos en alimentos de uso masivo, por lo cual, surge la necesidad investigar la adicción de una fuente de macronutrientes (proteína), como son los péptidos solubles de anchoveta, en todos los tipos de arroz disponibles en el mercado incluyendo el arroz fortificado con micronutrientes, que contribuyan a reducir los índices de desnutrición.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuáles son las condiciones óptimas del proceso para maximizar el rendimiento de péptidos solubles de anchoveta (*Engraulis ringens*) por acción enzimática a valor de 8 Brix referencial y cuál es el porcentaje óptimo de sustitución parcial de la harina de arrocillo por concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta a agregarse en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión, con alto contenido proteico y pérdida por cocción menor a 9%?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Cuáles son las condiciones de proceso que optimizan el rendimiento de péptidos solubles de anchoveta (*Engraulis ringens*) por acción de las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7090 mediante la concentración de enzima, sustrato y tiempo de reacción?
2. ¿Cuál es el porcentaje óptimo de sustitución de harina de arrocillo por concentrado proteico hidrolizado (*Engraulis ringens*) en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión maximizando el contenido proteico y con una mínima pérdida por y un mayor grado de similitud al grano de arroz?

3. ¿Cuáles son las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas del grano símil de arroz obtenido por extrusión?

### **1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Elaborar un grano símil de arroz obtenido por extrusión, enriquecido con péptidos solubles de anchoveta (*Engraulis ringens*) mediante acción enzimática, que reúna las características de calidad aceptables (contenido proteico, grado de similitud con el grano de arroz y pérdida de cocción) para su viabilidad como fortificante del arroz.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar los parámetros óptimos de concentración de enzima, sustrato, y tiempo de reacción en el proceso de hidrolisis de proteínas de la anchoveta entera por acción de las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7090 para maximizar el rendimiento de péptidos solubles al valor de 8 Brix referencial.
2. Determinar el porcentaje óptimo de sustitución de harina de arrocillo por concentrado proteico hidrolizado (*Engraulis ringens*) en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión maximizando el contenido proteico, con un menor porcentaje de pérdida por cocción y un mayor grado de similitud con el grano de arroz pilado.
3. Determinar las características de calidad (contenido proteico, grado de similitud con el grano de arroz y pérdida de cocción) y vida útil para la evaluación de viabilidad como fortificante del arroz.

#### **1.4. HIPÓTESIS CENTRAL DE LA INVESTIGACIÓN**

La concentración de enzimas combinadas (0.3g/100g sustrato), sustrato (50%) y tiempo (45min) de hidrolisis a una temperatura fija de 60°C generan un hidrolizado con 8°Bx ref., con presencia de solidos insolubles menor a 35% y un contenido graso menor al 2%, para su utilización como concentrado proteico hidrolizado en un 17.5% de sustitución de la harina de arrocillo en la formulación un grano símil de arroz obtenido por extrusión que presenta un contenido proteico mayor a 15%, un porcentaje de perdida por cocci3n menor a 10% y grado de similitud mayor a 5.

#### **1.5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Una manera de mejorar la calidad de los alimentos en las dietas de las poblaciones es a3nadiendo micro o macronutrientes a los alimentos de consumo masivo. Esto tiene efectos positivos duraderos en la vida de las personas al reducir deficiencias nutricionales. El enriquecimiento de alimentos es una forma segura de intervenci3n sostenible y rentable para la salud p3blica y el desarrollo econ3mico.

El arroz es un alimento b3sico para m3s de la mitad de la poblaci3n mundial, muchos de los cuales viven en la pobreza. Si bien es una buena fuente de energ3a, muchos nutrientes se pierden en el proceso de molienda, lo que la convierte en una fuente pobre de vitaminas y minerales esenciales. Seg3n las Directrices de la Organizaci3n Mundial de la Salud (OMS) sobre fortificaci3n del arroz, “Debido a su amplio consumo local, aceptabilidad y alcance, el arroz es un veh3culo alimentario b3sico que puede considerarse para prop3sitos de fortificaci3n en una intervenci3n a nivel poblacional” (WHO, 2018). Ahora que las tecnolog3as de fortificaci3n del arroz est3n bien establecidas y estudios publicados que proporcionan evidencia del impacto de la fortificaci3n del arroz, m3ltiples partes est3n



interesadas en enriquecer el arroz dirigido a programas sociales, así como al mercado masivo.

El presente trabajo aplica la metodología de la investigación científica para desarrollar un proceso biotecnológico ecoamigable, utilizando la hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos solubles de alta calidad y su aplicación uso como ingrediente en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión destinado a la fortificación del arroz de consumo masivo.

El estudio tendrá impacto positivo en el sector pesca, agroindustrial e industria alimentaria, que dispondrá de una base tecnológica optimizada y asequible, que aprovechará la proteína proveniente de un recurso natural pesquero de alta disponibilidad y bajo costo como es la anchoveta y el subproducto del pilado de arroz, para el enriquecimiento de un alimento de consumo masivo como es el arroz.

Los resultados potenciarán el uso de la anchoveta como fuente de alimento de consumo humano directo mediante la conversión en concentrados proteicos hidrolizados obtenidos por acción enzimática, utilizados para el enriquecimiento de del arroz. El proceso biotecnológico propuesto es asequible, posee datos experimentales confiables obtenidos a escala industrial, toda vez que la investigación se desarrolló en establecimientos con línea de procesos implementados.

## **II. MARCO TEÓRICO**

El presente marco teórico brinda una extensa revisión de la literatura científica y proporciona las bases teóricas de la investigación y los conceptos que sustentan el estado del arte sobre el proceso de hidrólisis enzimática, utilizando pescado como materia prima y el potencial de los hidrolizados obtenidos, en la formulación de un extruido a base de arroz, innovación en tecnología de hidrolizado y evaluación sensorial.

## 2.1. ANTECEDENTES

En el Perú existen una variedad de recursos que pueden fortificar a otros alimentos “vehículos” de consumo masivo para suministrar nutrientes adicionales para el desarrollo humano. Por ejemplo, la proteína de las especies de procedencia hidrobiológica, como la anchoveta *E. ringens*, podría ser una alternativa viable para elevar el valor nutricional de alimentos de consumo masivo con relativa baja cantidad de nutrientes. Esta especie, cuyos desembarques son de los más altos del país, es rica en proteínas que proveen aminoácidos esenciales, entre ellos destaca un importante contenido de lisina, vitaminas A y D en su componente graso, y además de minerales como potasio, hierro, fósforo y calcio que superan largamente a los valores reportados para el pollo o la res. El Gobierno peruano y el sector privado han realizado diversas campañas de difusión y promoción del potencial nutricional de la anchoveta peruana, sin embargo, el consumo humano directo aún no evoluciona favorablemente ya que la aceptabilidad del producto no se ha superado en el país. Una de las alternativas para indirectamente favorecerse de las propiedades nutricionales de la anchoveta se encuentra el desarrollo de procesos tecnológicos para obtener ingredientes proteicos que podrían actuar como enriquecedores nutricionales de alimentos de consumo masivo (TASA, 2023).

Para este fin, se han estudiado diversos procesos tecnológicos para obtener ingredientes proteicos de la anchoveta, entre los cuales destaca el proceso de hidrolisis enzimática. Este proceso se realiza modificando las propiedades biológicas de las proteínas utilizando temperaturas suaves, a un pH cerca de la neutralidad, que finalmente generan cadenas péptidas bien definidos y mejoran las características nutricionales y funcionales de los alimentos, ya que también se alteran las propiedades químicas, físicas e inmunológicas (BRF ingredients, 2022).

En principio, los parámetros de optimización son muy importantes de estandarizar para poder obtener hidrolizados proteicos conforme a necesidades específicas de grado de hidrólisis, amargor, porcentaje de grasa, entre otros. Estos aspectos varían en función de los elementos que intervienen en el proceso de hidrólisis, como el tipo y cantidad de enzimas, tipo de sustrato, temperatura, tiempo, entre otros. Por ejemplo, (Nilsan, Lertsiri, Suphantharika, & Assanaving, 2005) optimizaron la hidrólisis enzimática de concentrado soluble en pescado, este último, un subproducto de la industria pesquera. Para el hidrolizado de proteína de pescado (FPH) se utilizó Flavourzyme™ y Kojizyme™, dos enzimas comerciales. Kojizyme™ mejoró la formación de algunos aminoácidos de sabor amargo como el triptófano durante el proceso de hidrólisis, mientras que Flavourzyme™ no lo hizo. El FPH secado por pulverización producido con Flavourzyme™ resultó con 66% de proteína y la amargura de FPH fue menor que la de una solución de cafeína de 1 ppm comparado con la utilización de la otra enzima. Al respecto, se ha mostrado un interés creciente en la aplicación de agentes enmascaradores (como xilitol, sacarosa y maltodextrina) para mejorar las propiedades sensoriales (Bertelsen et al., 2018), dado que los parámetros de optimización pueden impactar en este y otros resultados.

En el país, se han desarrollado algunos estudios relacionados a la hidrólisis enzimática de la proteína de anchoveta *E. ringens* manipulando diferentes elementos del proceso. Por ejemplo, (Jimenez Revilla & Sanchez Monaca, 2022), evaluaron el efecto de la temperatura y concentración de enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 sobre el proceso de hidrolisis de proteínas de esta especie. En su estudio, optimizaron los parámetros del proceso concluyendo que las condiciones para la hidrólisis de anchoveta *E. ringens* entera con Corolase 8000 fueron de 3.0% p/p de enzima y 50°C de temperatura durante 120 minutos de hidrólisis, sin necesidad de utilizar Corolase 7089, alcanzando un

grado de hidrólisis (%GH) máximo de  $30.9 \pm 3.6$  % y una Recuperación de Proteína Soluble %RPS de  $84.3 \pm 0.8$  %.

En esa misma línea, Roldán, Omonte, & Molleda (2021), elaboraron polvo de hidrolizado de proteína de anchoveta sin cabeza y vísceras. En su estudio, evaluaron siete proteasas comerciales del tipo (1) Endopeptidasa: Corolase 7089, Corolase Hp, Corolase L10, Protex 6L Dresenzyme y Protamex: y (2) Exopeptidasa: Flavourzyme 1000L. Los grados Brix no corregido ( $^{\circ}\text{Bx ref.}$ ) y %GH fueron utilizados como valores para evaluar la actividad hidrolítica por las enzimas utilizadas. Protex 6L y Protamex con Flavourzyme 1000L presentaron mayor %GH sobre las proteínas de anchoveta. Los mayores valores de  $^{\circ}\text{Bx ref.}$  (11,50) y GH% (39,0 %) se lograron utilizando Protamex 0,2 % y Flavourzyme 1000L de 0,4 %.

El grado de hidrólisis y el nivel de amargor de los hidrolizados obtenidos de anchoveta (*E. ringens*) sin cabeza, piel, cola, ni vísceras, fueron evaluados por (Valerio, et al., 2023). Estos autores examinaron el efecto de las variables temperatura, tiempo y cantidad de enzima (Corolasa 8000 y Corolasa 7089) sobre el sustrato. En su reporte, los autores mencionan que las enzimas fueron utilizadas en tiempos secuenciales, obteniendo valores de optimización de  $60.1^{\circ}\text{C}$ , 93.4 min y 1.68 % de enzima Corolasa 8000, permitiendo %GH de 12.8 %, y  $49.1^{\circ}\text{C}$ , 54.3 min y 0.472 % de enzima Corolasa 7089, que finalmente maximizó el %GH a 14.8% y minimizó el nivel de amargor (3.8).

De forma similar, se han reportado otras investigaciones sobre hidrólisis de proteínas utilizando como sustrato la anchoveta peruana entera y sus residuos realizados a escala piloto (Pandía et al., 2013) y utilizando la enzima Protamex (Sifuentes-Penagos, Leon, & Castillo, 2018).

Los antecedentes previos resaltan los intentos por darle protagonismo al valor nutricional de la anchoveta por medio de los hidrolizados proteicos a través de estudios de optimización y su potencial utilización como insumo para la elaboración y fortificación de alimentos. En este contexto, a nivel industrial se vienen desarrollando algunos productos derivados de la anchoveta. Así, la Sociedad Nacional de Pesquería (SNP) a través de una de sus empresas asociadas APROPISCO S.A.C en cofinanciamiento con el Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA) y el ITP, órganos adscritos al Ministerio de la Producción (PRODUCE), han elaborado un “Concentrado proteico hidrolizado y desodorizado de anchoveta”, un alimento funcional con más del 80% de proteínas libre de olor y sabor, obtenidos a partir de procesos tecnológicos (eliminación de grasa y membrana lipídica; solubilización y precipitación isoelectrica de proteínas; hidrolizado enzimático, ultra/nanofiltración y secado por atomización) (PRODUCE, 2022).

Otros esfuerzos han alcanzado un nivel de producción para venta al público como por lo hecho por la empresa COLPEX INTERNATIONAL SAC, que desde el año 2021, cuenta con la única planta de procesamiento de proteínas de pescado hidrolizadas enzimáticamente y viene comercializando “Concentrado proteico hidrolizado de pescado en polvo” a los diversos mercados internacionales, utilizando como sustrato la anchoveta entera (Sifuentes, 2023). En esa misma línea, los esfuerzos por poner en valor nutricional de la anchoveta también vienen de instituciones públicas. El Instituto Tecnológico de la Producción – ITP red CITE, patentó el “Proceso de Obtención del Concentrado Proteico Funcional Seco e Hidratable de Anchoveta (*Engraulis ringens*)” (Resolución N° 001332-2018/DIN-INDECOPI), el cual está destinado a describir los pasos para que el producto final sea utilizado en la preparación de hamburguesa, albóndiga, sopa. (INDECOPI, 2018).

Así, por ejemplo, Egerton et al., (2018) realizaron la caracterización de hidrolizados de proteínas de merlán azul (*Micromesistius poutassou*) y su aplicación en el enriquecimiento de bebidas. Para esto, evaluaron seis enzimas comerciales para producir hidrolizados de proteínas de pescado en polvo. Las propiedades químicas y funcionales de las proteínas de pescado en polvo fueron comprobadas. Además, tuvieron alta solubilidad (> 80%) en un amplio rango de pH en agua y mejoró en matriz de bebidas de vitaminas y té (>85%).

Lo anterior mencionado resalta el hecho que el hidrolizado de anchoveta puede ser un insumo con valor nutricional relevante a ser utilizado en formulaciones o incluido para fortificar otros alimentos. El arroz, al ser un alimento de consumo masivo que pierde nutrientes durante su proceso productivo, es ideal para ser enriquecido utilizando la tecnología de extrusión que modifica las propiedades organolépticas del alimento (Gimferrer, 2009). Este alcance podría representar se útil para enriquecer el arroz con los aminoácidos esenciales provenientes de la proteína de anchoveta hidrolizada. Tomando en cuenta, que un alimento enriquecido es el alimento al que se le vuelve a añadir los nutrientes que perdieron durante su procesamiento (NCI, 2023).

El Gobierno del Perú, a través del Ministerio de Salud ha dado pasos importantes respecto de utilizar “vehículos” de alcance masivo, como el arroz, para administrar nutrientes esenciales a la población. Esto se inició con la fortificación del arroz con vitaminas (A, B1, B3, B6, B12, D, E, ácido fólico,) y minerales (hierro y zinc) mediante la aprobación de la Resolución Ministerial N° 745-2018/MINSA de fecha 15 de agosto del 2018, en la cual se aprobaron tres (03) Fichas de Homologación de Arroz Fortificado (Arroz fortificado grado extra; Arroz fortificado grado superior y Arroz fortificado grado corriente), las mismas que fueron modificadas mediante Resolución Ministerial N° 564-2022/MINSA de fecha 27 de julio del 2022. Asimismo, el Congreso de la República del Perú el 18 de agosto

del 2021, promulgo la Ley N° 31348, Ley que propone el enriquecimiento del arroz en el Perú, la misma que dispone el enriquecimiento del arroz destinado al consumo humano directo en el país, ya sea este nacional, donado o importado, con el fin de contribuir a la disminución de la desnutrición infantil y mejorar el estado de nutrición y salud de la población en general (Congreso de la Republica del Perú, 2021). La misma que actualmente se encuentra pendiente de la aprobación de su reglamentación

Existe en el país algunas experiencias fortificando alimentos con hidrolizados de anchoveta, como lo registrado por (Samamé, 2016) quien utilizando un hidrolizado de anchoveta obtenido por vía enzimática, sustituyó parcialmente la leche en polvo en la elaboración de una galleta dulce, optimizando la formulación a través de la metodología de superficie de respuesta. Los valores optimizados para la elaboración del producto fueron de 92 % de hidrolizado de Anchoveta, a una temperatura y tiempo de horneado de 180 °C y 13 minutos, la cual obtuvo la aceptabilidad general de “me gusta bastante”.

Por lo tanto, el proceso de hidrólisis enzimática viabiliza la obtención de ingredientes proteicos de la anchoveta para el consumo humano; como son los concentrados proteicos hidrolizados, los cuales pueden ser utilizados para el enriquecimiento de alimentos masivos, como el arroz, con el objetivo de suministrar nutrientes esenciales a la población y darle valor a alimentos de origen animal que de otra manera no encuentran aceptabilidad en el consumo directo.

## **2.2. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1. Arroz**

Es el grano procedente de cualquier cultivar de la especie gramínea *Oriza sativa L* (NTP 205.011, 2021). Es el segundo cereal más producido en el planeta en términos de volumen y el primero en términos de consumo humano ya que casi la totalidad del arroz producido se

destina al consumo directo. El Perú es el segundo productor latinoamericano con una producción anual de 3 Millones de toneladas (Mt). Unas de las principales características del cultivo en Perú son los altos rendimientos, que sobrepasan en promedio  $8 \text{ t ha}^{-1}$ , gracias, entre otros, a la fertilidad de suelos de origen volcánico. Existen inclusive regiones norteñas como Áncash y La Libertad, así como la región de Arequipa al sur del país, donde los rendimientos promedio sobrepasan  $12 \text{ t ha}^{-1}$  (Paredes et al., 2021)

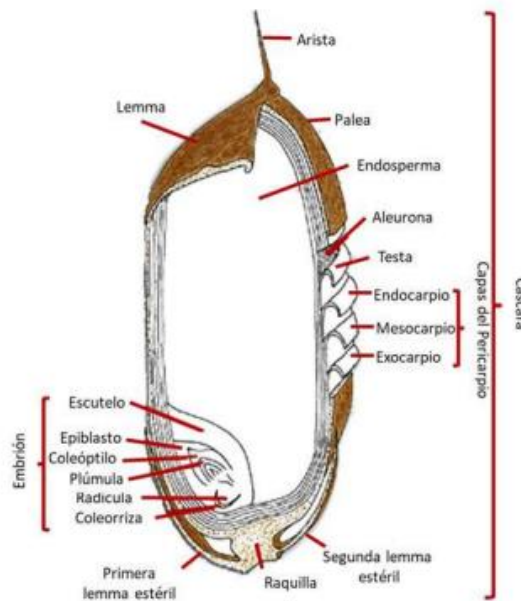


Figura 1. Estructura de grano de arroz

Fuente: Paredes et al., 2021

De acuerdo al proceso productivo al que es sometido, el arroz se define como:

- a) **Arroz pilado o blanco** es el grano de arroz, entero y quebrado al cual se le ha removido la cáscara, los embriones y pericarpio o cutícula, en un procesamiento normal del arroz en cáscara (NTP 205.011, 2021).
- b) **Arroz elaborado** es el arroz descascarado del que se han eliminado, parcial o totalmente, por elaboración, el salvado y el germen (NTP 205.011, 2021).



- c) **Arroz elaborado parbolizado**, es aquel cuyo almidón ha sido totalmente gelatinizado por inmersión del grano con cáscara en agua apta para consumo humano y luego sometido a un tratamiento con vapor de agua a presión y secado; presenta un color amarillento (NTP 205.011, 2021).
- d) **Arroz añejo**, es el arroz que ha sido sometido a temperaturas específicas y humedad durante un tiempo variable, bajo un proceso natural o industrial, para mejorar su calidad culinaria, mejorar su graneado y aumentar el rendimiento en olla. (PNAEQW, 2023).
- e) **Arroz elaborado ceroso o glutinoso**, es el arroz de tipo especial (*O. sativa* L. *glutinoso*) cuyos granos tienen una apariencia blanca y opaca que por cocción tienden a adherirse entre sí debido a que están constituidos casi íntegramente por amilopectinas (NTP 205.011, 2021).
- f) **Arroz descascarado, arroz pardo, arroz integral, brown rice**; es el arroz del que sólo se ha eliminado la cáscara. El proceso de descascarado y manipulación puede ocasionar una pérdida parcial del salvado. (NTP 205.011, 2021).

### 2.2.2. Composición química y nutricional del arroz

El arroz limpio, ya desprovisto de su salvado, suele tener menos fibra dietética que otros cereales y, por lo tanto, es más digerible. Puede ser un alimento de sustento, a pesar de su bajo contenido en riboflavina y tiamina, y proporciona mayor contenido calórico y más proteínas por hectárea que el trigo y el maíz. El arroz no contiene gluten, por lo que es apto para el consumo por parte de personas que padecen trastornos relacionados con el gluten, tales como la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten no celíaca (Penagini et al., 2013).

Tabla 1. Análisis proximal (g/100g) de arroz crudo y cocido

Producto	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Carbohidratos
Arroz blanco crudo	10,87±0,02b	0,67±0,04a	7,87±1,05a	1,14±0,06a	79,45±2,45a
Arroz blanco cocido	70,12±0,01a	0,28±0,01b	2,96±0,34b	0,44±0,03b	26,20±1,04b
Arroz integral crudo	9,76±0,07b	1,27±0,05a	9,21±1,14a	2,86±0,17a	76,90±3,22a
Arroz integral cocido	72,64±1,12a	0,86±0,08b	3,41±0,57b	0,78±0,06b	22,31±0,98b

a,b: Los valores de una misma columna acompañados de una letra diferente son significativamente diferentes (P < 0,01).

Fuente: (Girón, 2017)

Aunque los cereales en general son deficientes en lisina, las proteínas de arroz tienen los niveles más altos de aminoácidos esenciales (Tabla 2), con un 71 % para arroz integral y 67 % para arroz blanco (Dos Santos, 2021).

Tabla 2. Perfil de Aminoácidos de arroz integral y blanco

Aminoácidos (g/16g de Nitrógeno)	Arroz Integral	Arroz Blanco
Arginina	7.2	7.9
Histidina	2.4	2.2
Isoleucina	4.0	4.1
Leucina	7.9	7.8
Lisina	3.6	3.4
Metionina	2.1	2.2
Metionina + cisteína	3.3	4.2
Fenilalanina	4.9	5.1
Fenilalanina + Tirosina	8.5	8.3
Treonina	3.5	3.4
Triptófano	1.2	1.1
Valina	5.6	5.8
Puntuación de aminoácido (%)	71	67

Fuente: Adaptado de Dos Santos (2021)

### 2.2.3. Producción del arroz

El cultivo de arroz en el Perú se constituye en uno de los cultivos de mayor relevancia, con la mayor área sembrada y cosechada (bordea las 400 mil hectáreas en promedio), con superficies mayores que la papa y el maíz amarillo, y es el componente esencial de la canasta

básica de consumo nacional (MINAGRI, 2019). La industria molinera en el país cuenta con una capacidad de pilado de 991.9 Ton/h., equivalente a 8 millones de toneladas al año. En la actualidad solo se utiliza el 30 % de la capacidad instalada, lo cual resulta suficiente para los 2.4 millones de producción anual. La costa norte actualmente alberga los molinos de mayor envergadura y cuenta con una capacidad de pilado sobredimensionada (MINAGRI, 2020).

Según el MIDAGRI, (2023), la producción de arroz pilado en el Perú ha mostrado un crecimiento en los últimos de los años (Tabla 3), ubicándose en el puesto 20 de los países con mayor producción en el mundo.

Tabla 3. Estimado de producción de arroz pilado por campaña en el mundo en los últimos 6 años (millones de toneladas)

Posición	País	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021	2021/2022	2022/2023	2023/2024
	Total	495,0	498,2	498,2	509,2	513,9	512,8	520,9
1	China	148,9	148,5	146,7	148,3	149,0	145,9	149,0
2	India	112,8	116,5	118,9	124,4	129,5	136,0	134,0
3	Bangadesh	32,7	34,9	35,9	34,6	35,9	36,4	37,0
4	Indonesia	37,0	34,2	34,7	34,5	34,4	34,0	34,5
5	Vietnam	27,7	27,3	27,1	27,4	26,7	27,0	27,0
6	Tailandia	20,6	20,3	17,7	18,9	19,9	20,2	19,7
7	Burma	13,2	13,2	12,7	12,6	12,4	11,8	12,5
8	Filipinas	12,2	11,7	11,9	12,4	12,5	12,6	12,6
<b>20</b>	<b>Perú</b>	<b>2,1</b>	<b>2,5</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>
	Otros Países	48,7	49,0	51,0	51,7	49,8	50,0	51,2

Fuente: Observatorio de Commodities-MIDAGRI, (2023).

En cuanto a la producción por regiones naturales, en el Perú este grano se produce en la Costa y la Selva. En los años 2017 y 2022 más del 55 % de la oferta arrocera nacional provino de la Costa y alrededor del 45 % de la Selva. La mayor concentración de la producción de arroz en la Costa norte del país (84 %), desde Tumbes hasta Ancash. (ver tabla 4).

Tabla 4. Producción de arroz con cascara según región natural 2017-2023 (toneladas)

Región	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2022 a/	2023 a/
<b>Total</b>	3,038,766	3,557,900	3,190,969	3,434,199	3,538,142	3,446,365	2,238,378	216,957
<b>Costa Norte</b>	<b>1,174,395</b>	<b>3,557,900</b>	<b>1,243,295</b>	<b>1,417,835</b>	<b>1,516,651</b>	<b>1,421,004</b>	<b>1,064,599</b>	<b>1,044,951</b>
Lambayeque	400,575	1,595,297	328,520	429,615	437,240	440,156	404,249	389,461
Piura	378,864	481,921	397,493	417,734	582,407	482,421	231,057	230,112
La Libertad	206,995	513,515	328,797	384,270	296,526	309,349	305,873	304,580
Tumbes	123,537	387,546	122,489	113,030	126,255	128,633	62,975	58,833
<b>Ancash</b>	<b>64,425</b>	<b>129,194</b>	<b>65,996</b>	<b>73,185</b>	<b>74,223</b>	<b>60,445</b>	<b>60,445</b>	<b>61,965</b>
<b>Costa Sur</b>	281,393	83,120	278,894	284,336	6,279,735	280,697	280,326	275,536
(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)
<b>Selva Alta</b>	1,409,977	1,511,684	1,468,719	1,553,230	1,549,769	1,524,441	814,142	777,012
(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)
<b>Selva Baja</b>	173,001	174,325	200,061	178,798	180,694	220,223	79,310	72,072
(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)

a/ Enero a junio

Fuente: Observatorio de Commodities-MIDAGRI, (2023).

#### 2.2.4. Variedades de arroz en el Perú

El MIDAGRI (2020) menciona que existen cerca de diez mil variedades de arroz. Sin embargo, las principales variedades de arroz que se cultivan en los diferentes valles arroceros del Perú son aproximadamente 30, y la mayoría se originaron en el Programa de Investigaciones en Arroz – Perú (PIA-Perú). Estas variedades provienen del Internacional Rice Research Institute (IRRI – Filipinas) y del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT – Colombia). Las principales variedades de arroz que se cultiva en la costa norte son la Viflor, Inti, Sican, Costa Norte, Taymi, Oro, Santa Ana, San Antonio y NIR-I.

#### 2.2.5. Subproductos de producción de arroz

La calidad del grano de arroz depende en un 70% del acondicionamiento físico que ha tenido el arroz cáscara, y en un 30% al equipo utilizado para el pilado. Este último aspecto estará en función del tipo de maquinaria, condiciones, estado y regulación de cada una de ellas, influyendo directamente sobre el volumen generado de subproducto tales como el arrocillo (granos quebrados), ñelen (menor a ¼ de tamaño del arroz normal), polvillo (arroz en polvo) y pajilla (Najar & Alvares, 2007).



Figura 2. Subproductos del proceso de pilado de arroz

Fuente: Agroportunidades, (2023)

El procesamiento del arroz por parte de la industria genera diversos tipos de arroz partido (ver figura 3), los mismos que se producen en función del tipo de procesamiento al cual es sometido el arroz.

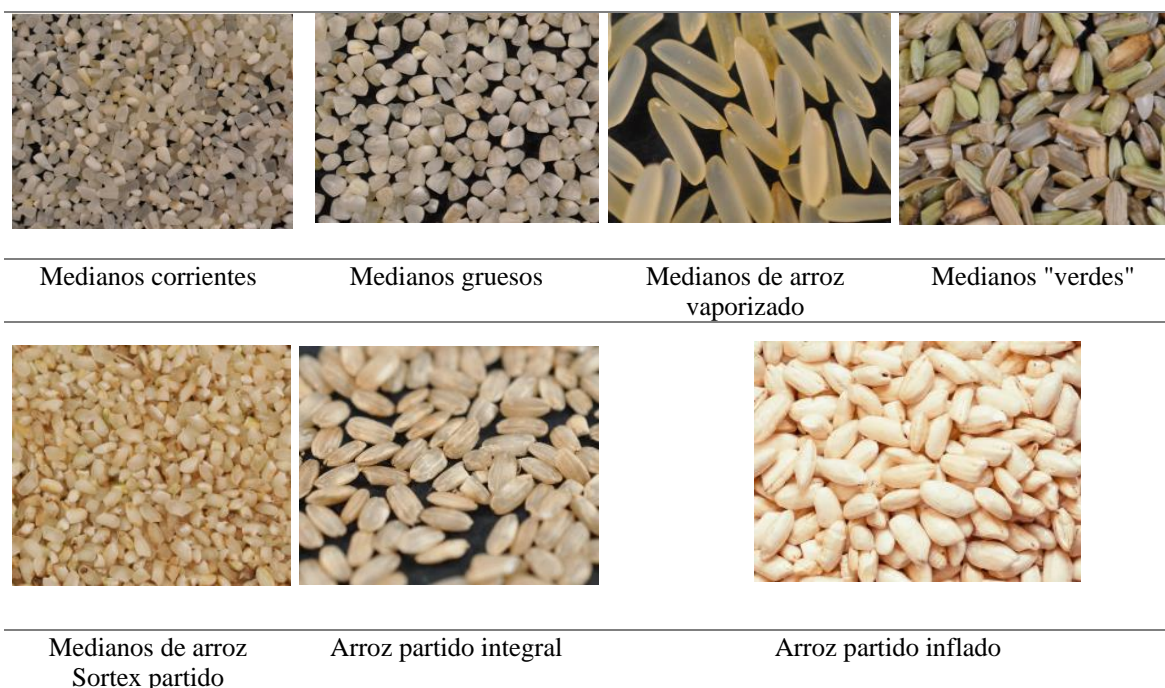


Figura 3. Tipos de arroz partido

Fuente: (Industrias Ralda, 2023)

### 2.2.6. Anchoqueta Peruana

La anchoqueta (*Engraulis ringens*) es un pez de la familia *Engraulidae* que vive en la zona sureste del Océano Pacífico, frente a las costas de Perú y Chile (Iwamoto et al., 2020). La anchoqueta es una especie pelágica, de talla pequeña, que puede alcanzar hasta los 20 cm de longitud total, su cuerpo es alargado y poco comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes, su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre. Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16° y 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno, con hábitos altamente gregarios formando enormes y extensos cardúmenes que, en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud (IMARPE, 2020).



Figura 4. Anchoqueta (*Engraulis ringens*)

Fuente: PNIPA, (2021)

La anchoqueta es un alimento con alto valor biológico y proteico, dado que aporta proteínas similares a la carne, no contiene carbohidratos (almidones y azúcares), es rica en vitamina A, vitamina C y vitaminas del complejo B, brinda calcio, fósforo, potasio y minerales como el hierro y zinc, componentes que ayudan a prevenir la anemia y contribuir con el crecimiento y desarrollo de los niños (Tabla 5). Además, posee omega 6 y 3, grasas esenciales que nuestro organismo no produce. Por otro lado, su alto valor en proteínas

permite que los músculos se regeneren más rápido, fortaleciendo los tendones y ligamentos. También es un alimento rico en Lisina (Tabla 5), un aminoácido imprescindible para el crecimiento de los niños, así como la vitamina D, la cual evita el raquitismo (Promperú, 2020).

Tabla 5. Composición química y nutricional de la anchoveta

<b>Componente</b>	<b>Promedio</b>
Humedad (g/100g)	70.8
Grasa (g/100g)	8.2
Proteína (g/100g)	19.1
Sales minerales (g/100g)	1.2
Cenizas (g/100g)	3.7
Energía (Kcal/100g)	185
<b>Ácidos Grasos</b>	
C20:5 Ac. Eicosapentaenoico – EPA (mg/100g)	18.7
C22:6 Ac. Docosahexaenoico – DHA (mg/100g)	9.2
C16:1 Ac. Palmitoleico - Omega 7 (mg/100g)	10.5
<b>Minerales Macroelementos</b>	
Sodio (mg/100g)	78.0
Potasio (mg/100g)	241.4
Calcio (mg/100g)	77.1
Magnesio (mg/100g)	31.3
<b>Microelementos</b>	
Hierro (ppm)	30.4
Cobre (ppm)	2.1
Calcio (mg)	77
Vitamina A (ug)	15
Tiamina (mg)	15
Riboflamina (mg)	0.21
Vitamina C (mg)	8.7
Fósforo (mg)	276

Fuente: Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú-IMARPE/ITP (1996); Tablas Peruanas de Composición de Alimentos del CENAN, (2017); TASA, (2023).

Tabla 6. Perfil de aminoácidos del músculo de anchoveta

Aminoácidos	Promedio
Triptófano (mg/g)*	7.9
Lysina (mg/g)*	64.9
Isoleucina (mg/g)*	34.1
Valina (mg/g)*	35.7
Leucina (mg/g)*	61.6
Histidina (mg/g)*	11.8
Threonina (mg/g)*	32.0
Metionina (mg/g)*	22.3
Phenilalanina (mg/g)*	35.6
Arginina (mg/g)*	84.6
Aspartato (mg/g)*	72.5
Serina (mg/g)*	24.0
Glutamina (mg/g)*	129.5
Prolina (mg/g)*	28.9
Glycina (mg/g)*	32.1
Alanina (mg/g)*	20.9
Cysteina (mg/g)*	0.0
Tyrosina (mg/g)*	22.5
Total AA (mg/g)*	721.1

\* Mg/g proteína de musculo de anchoveta

Fuente: Adaptado de Pariona-Velarde, (2020)

### 2.2.7. Hidrolisis Enzimática de proteínas

La hidrólisis enzimática es un método rápido, amigable con el ambiente y en el que se pueden controlar los pesos moleculares de los péptidos formados. Este método puede mejorar las propiedades biológicas y funcionales de las proteínas y sus péptidos utilizando proteasas comerciales derivadas de fuentes animales, vegetales y microbianas (Luna-Vital et al., 2015; Gao et al., 2021, Siddik et al., 2020). Además de las enzimas comerciales, a nivel de investigación se han utilizado extractos crudos de enzimas con origen microbiano, generando nuevos péptidos proteicos a escala de laboratorio, pero con limitaciones para imitar exitosamente en la escala industrial (Su et al., 2011).

A diferencia de los métodos químicos, la hidrólisis enzimática utiliza condiciones suaves y es fácil de controlar haciendo más precisa la escisión de enlaces peptídicos. El



proceso no implica la presentación de reacciones secundarias del producto ni disminución del valor nutricional (Tavano, 2013). Además, presenta mayor facilidad en la recuperación de proteínas y purificación de algunos péptidos (Pasupuleti & Braun, 2010). Por estas razones, se ha prestado cada vez más atención a producir hidrolizados con propiedades nutricionales, funcionales y bioactivas mejores y más definidas (Benjakul et al., 2014).

La producción de péptidos inicia con la fermentación (proceso seguro, ecológico y rentable), que implica la incubación de microorganismos secretoras de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas tienen características específicas en la metabolización de proteínas, generando así los llamados hidrolizados, que están conformados por una mezcla de diferentes tipos de péptidos (Raveschot et al., 2018; Lee et al., 2017).

El proceso de hidrólisis enzimática se suele realizar en un reactor con controles de temperatura, pH, agitación y tiempo (Benítez et al., 2008). Inicialmente, la temperatura y el pH de la mezcla homogénea obtenida del pretratamiento se ajustan según las condiciones ideales de trabajo de la enzima. Cuando se agrega proteasa, la reacción entre la enzima y el sustrato provoca cambios en el pH de la solución, debido a la ruptura de los enlaces peptídicos, para formar nuevos grupos amino o carboxilo capaces de liberar o aceptar protones. Frente a lo anterior, algunos métodos se basan en la adición de solución tampón para moderar los cambios de pH (Ovissipour et al., 2009; Ovissipour et al., 2012; Shirahigue et al., 2016). Sin embargo, se considera que la presencia de sales en soluciones tampón puede afectar propiedades funcionales de interés, como la capacidad emulsionante y espumante (Kristinsson & Rasco, 2000). Mientras tanto, otros estudios optan por mantener el pH óptimo de la actividad enzimática, mediante la adición constante de solución neutralizante durante el proceso de hidrólisis (Dong et al., 2008; Hsu, 2010; Kechaou et al., 2009; Klompong et al., 2007; Silva et al., 2014). En ambos procesos, cuando se obtiene el grado de hidrólisis

esperado, la peptidasa se desactiva por cambios de temperatura, pH o ambas variables simultáneamente (Benítez et al., 2008).

La elección de la enzima depende tanto del producto final como del precio (Benjakul et al., 2014), también es importante considerar la composición de aminoácidos de la proteína porque algunas proteasas tienen preferencias por la escisión de ciertos enlaces peptídicos (Pasupuleti & Braun, 2010). Cabe mencionar que el medio en el que actúan las enzimas es un factor de elección, por ejemplo, aquellas cuyo pH óptimo es ácido pueden inhibir el crecimiento bacteriano, pero tienen bajos porcentajes de recuperación de proteína y menor valor nutricional y funcional en comparación con las proteasas alcalinas y neutras (Kristinsson & Rasco, 2000). Esta es la razón por la que las proteasas microbianas con alta actividad proteolítica son las más comúnmente utilizadas y adecuadas en la producción de hidrolizados a partir de tejidos de peces (Benjakul et al., 2014). Los hidrolizados de proteínas también se pueden obtener mediante el uso de proteasas presentes en el sistema digestivo del pescado como pepsina, tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa (Vannabun et al., 2014). La autólisis se ha utilizado ampliamente para obtener salsa de pescado y ensilajes (Kristinsson & Rasco, 2000). Bougatef et al. (2008), que produjeron hidrolizados de proteínas a partir de cabezas y vísceras de la sardinella *Sardinella aurita* mediante temperaturas de autólisis de 40 C a 50 C y pH 8, encontrando que la adición de una enzima externa puede acelerar la reacción y aumentar el grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis está influenciado por diferentes parámetros como la relación E/S, el pH, la temperatura y el tiempo de incubación. Los tres primeros tienen un efecto en la velocidad de reacción, mientras que el último solo afecta el grado de hidrólisis (Benítez et al., 2008). Puede ser el método de medición más adecuado, ya que la interacción de los factores antes mencionados con la elección del sustrato y la enzima están directamente relacionados con la cantidad de péptidos de bajo peso molecular, la recuperación de

proteínas (Ovissipour et al., 2009) y las propiedades bioactivas y funcionales de hidrolizados (Klompong et al., 2007).

### 2.2.8. Grado de hidrólisis

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

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

%GH : Grado de hidrólisis expresado en porcentaje

h (meqv g<sup>-1</sup>) : Numero de enlaces hidrolizados

h<sub>tot</sub> : número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína; h<sub>tot</sub> depende de la fuente de proteína, siendo para pescado h<sub>tot</sub>=8,6 meqv g<sup>-1</sup> .

Un indicador para medir el proceso de hidrólisis a nivel industrial es el °Brix referencial (Bx ref). El °Bx referencial es un indicador que mide la cantidad de sólidos solubles presentes en el alimento expresados en porcentaje de sacarosa. Los hidrolizados proteicos presentan una determinada cantidad de sólidos soluble que se incrementa conforme se hidroliza la proteína, por ello al no medir sólo azúcar, la lectura del refractómetro se denomina medición de grado Brix no corregido (Optronic, 2020). Se considera que a mayor hidrólisis mayor desdoblamiento de las proteínas y con ello mayor valor de °Bx ref. y GH%. (Roldán et al., 2021).

### 2.2.9. Proteasas

Tipo de enzima que descompone las proteínas en unidades proteínicas más pequeñas, como péptidos o aminoácidos (HIVinfo, 2021). Las proteasas, peptidasas o proteolíticas son parte de un extenso grupo de enzimas que cumplen la función de romper los enlaces peptídicos de las proteínas de manera selectiva, generando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres; teniendo una alta especificidad por el sustrato (Sabotič & Kos, 2012). Estas enzimas son producidas por animales, plantas, bacterias y hongos y son importantes en diversos procesos fisiológicos y metabólicos. Asimismo, son de gran importancia en la industria alimentaria, medicina, farmacia, detergentes y cueros, entre otros (Theron & Divol, 2014)

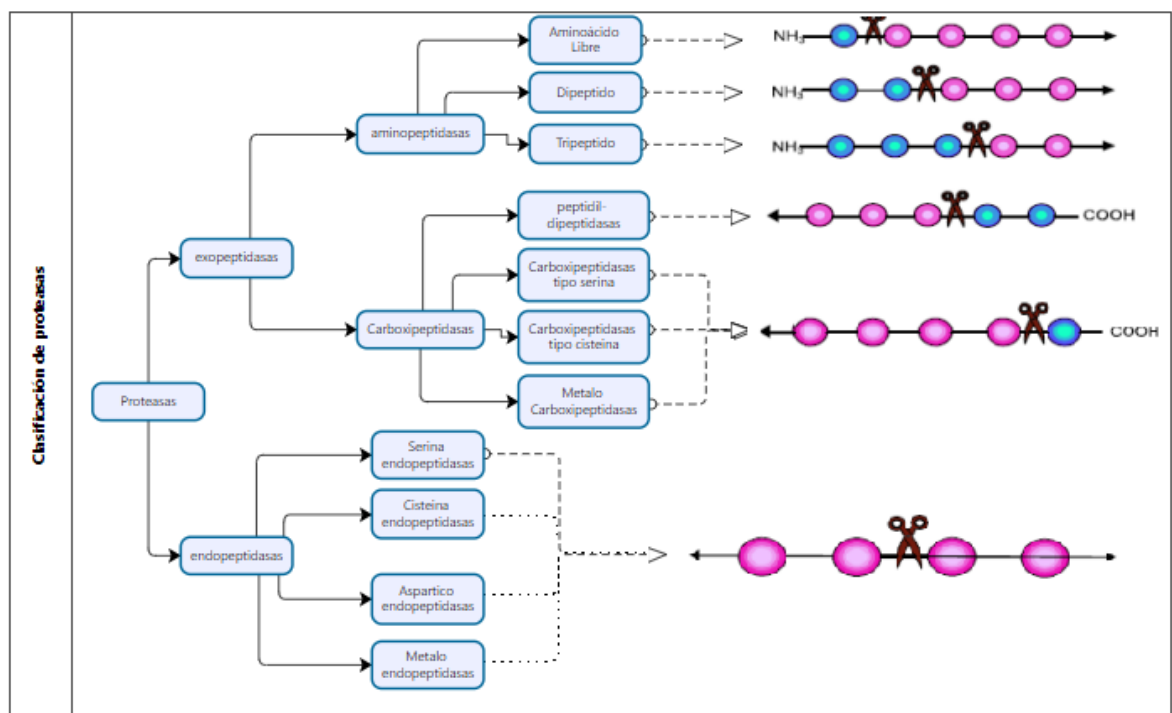


Figura 5. Clasificación de las proteasas

Fuente: Adaptado de (Theron & Divol, 2014)

### 2.2.10. Clasificación de las Proteasas

Las enzimas proteasas se pueden clasificar según su sitio de acción, el pH de acción y la naturaleza química del sitio catalítico. Por su sitio de acción se dividen en exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.22-99) (Figura 5). Las primeras actúan sobre los extremos de la cadena polipeptídica, por el extremo amino (aminopeptidasas) o en el carboxilo (carboxipeptidasa), mientras que las endopeptidasas actúan en regiones internas de la cadena polipeptídica (Barrett, 1994)

### 2.2.11. Proteasas comerciales

El uso de las enzimas proteolíticas en la industria alimentaria comenzó con las proteasas pancreáticas de animal; no obstante, las proteasas bacterianas y fúngicas han tomado relevancia a nivel industrial en el último tiempo. En la Tabla 7 se describen algunas proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado; estos preparados suelen ser mezclas concentradas y estabilizadas de enzimas y generalmente se presentan en estado líquido o en pellets secos.

Tabla 7. Características de las proteasas comerciales

Enzima	Rango de pH	Temperatura (°C)	Especificidad
Pepsina	1.5-2.5	35-50	Endo
Tripsina	7-9	30-60	Endo
Quimiotripsina	8-9	45-55	Endo
Pancreatina	7.5-8.5	35-50	Endo/Exo
Alcalasa 2.4 L	6.5-8.5	55-70	Endo
Flavourzima 1000L	5.5-7.5	50-55	Endo/Exo
Neutrasa,	5.5-7.5	45-55	Endo
Corolasa 7089	5.5-7.5	<60	Endo
Corolasa PN-L	5.0-8.0	<50	Endo/Exo
Corolasa LAP	6.0-9.0	<70	Exo
Corolasa 8000	6.0-10.0	<80	Endo/Exo
Umamizyme,	7.0*	45*	Endo/Exo
Protamex	5.5-7.5	35-60	Endo
Papaína	5.0-7.0	65-80	Endo / Exo
Bromelina	3.0-9.0	50-60	Endo / Exo

\*Condiciones óptimas

Fuente: Adaptado de Espinoza & Castillo, (2022) & ABenzymes, (2023)

## **2.2.12. Aplicación de los hidrolizados de pescado en la industria alimentaria.**

Los hidrolizados de pescado se pueden utilizar como ingredientes alimentarios y E4s para aumentar las actividades de emulsificación, formación de espuma o dispersión de los alimentos, mejorando su uso potencial como multipropósito, ingredientes funcionales en alimentos procesados. Además, los hidrolizados de proteína de pescado con actividad antioxidante se pueden utilizar en alimentos para prolongar su vida útil (Dekkers et al, 2011; Halim et al, 2016),

Con un conocimiento más profundo del valor nutricional y los beneficios para la salud de los hidrolizados de pescado, los péptidos bioactivos con actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, neuroprotectoras o antihipertensivas se pueden utilizar en alimentos funcionales, productos farmacéuticos y cosméticos (Senevirathne & Kim, 2012).

Los péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas de pescado han sido aplicados a la industria de alimentos funcionales. En la actualidad, su comercialización ha despertado el interés de los consumidores por los beneficios sobre la salud humana, por lo que se han desarrollado productos alimentarios incluyendo las bebidas, así como en forma de tabletas cápsulas, polvos y líquidos. Algunos productos comerciales se muestran en la Tabla 8. Por ejemplo, el Beauttycoll<sup>®</sup> promueve el envejecimiento saludable, la salud de las articulaciones y los huesos para un estilo de vida activo, previniendo el envejecimiento de la piel y apoyar a los tejidos conectivos, Bonito peptide y Vasotensin<sup>®</sup> actúan en la regulación de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), Seacure<sup>®</sup> ayuda a la cicatrización de heridas y apoya al sistema inmunológico, finalmente, PEPTIBAL<sup>®</sup> mantiene el sistema inmunológico saludable en el intestino y reduce la inflamación mejorando la fisiología de la piel (Espinoza & Castillo, 2022).

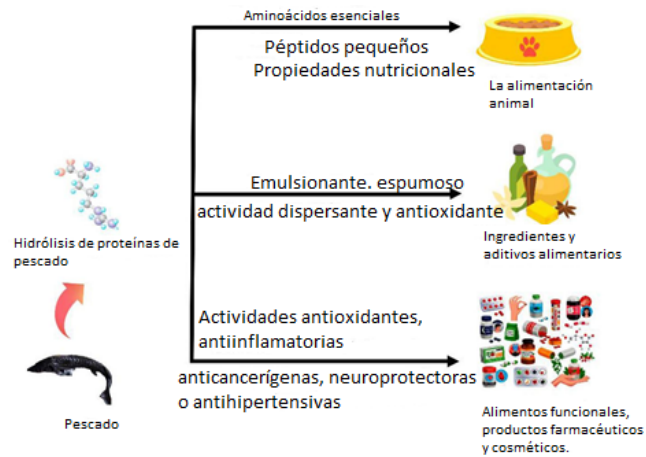







Figura 7. Aplicaciones de los hidrolizados de proteínas de pescado

Fuente: (Espinoza & Castillo, 2022)

Tabla 8. Productos comerciales de péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas de pescado

Nombre del producto	Industria / País	Composición	Presentación
Beautycoll® (Peptan)	Beautycoll / UK	Péptidos de colágeno de pescado	
Bonito peptide	Nippon Supplement Inc. / Japan	Péptidos derivados de pescado Bonito	
Vasotensin®	Metagenics / US	Suplementos dietéticos de pescado de Bonito	
Seacure®	Proper Nutrition Inc. / US	Suplemento de proteína de pescado pacífico	
PEPTIBAL®	Virage Sante INC. / Canadá	Hidrolizados de proteínas de pez tiburón en cápsulas	

Fuente: (Espinoza & Castillo, 2022)

Respecto al proceso de inclusión como ingrediente en otros alimentos, se requieren condiciones óptimas y formulaciones de matriz adaptadas al secado para evitar daños

severos por calor que conducen a una pérdida de bioactividad (Schutyser et al., 2012). De manera similar al secado por aspersión de otros polvos de hidrolizado de pescado, los parámetros críticos que se pueden controlar son la temperatura de entrada, la temperatura de salida y la velocidad de alimentación (Fang et al., 2016).

En algunos casos, el péptido en polvo puede inducir un sabor amargo y un olor indeseable (Mohan et al., 2015), esto requiere considerar las condiciones de secado adecuadas para enmascarar el efecto negativo en la matriz del alimento.

Aunque la bioactividad de los hidrolizados de proteínas los hace adecuados para ingredientes alimentarios funcionales, su reactividad química con diferentes moléculas, principalmente azúcares reductores, puede provocar una modificación de su estructura y, por tanto, de su función tras su inclusión en matrices alimentarias.

### **2.2.13. Extrusión de alimentos**

La extrusión es la operación de dar forma a una sustancia plástica o material moldeable forzando su paso a través de una restricción o apertura. Se emplea, principalmente, en alimentos ricos en almidón y en proteína (productos de confitería, alimentación infantil, cereales para desayuno, snacks, alimentos deshidratados, entre otros) (Murillo, 2020). Ésta se puede realizar en frío, sin aplicar temperatura, solo presión (pasta sin cocción, salchichas, pastas para confitería, entre otros) o en caliente, con aplicación de energía térmica y mecánica (cereales de desayuno, modificación de harinas, snacks, análogos cárnicos, proteína texturizada) (Valverde, 2020).

Durante el proceso de extrusión, el almidón sufre algunos cambios importantes, especialmente la gelatinización, la despolimerización y la dextrinización, debido a la alta temperatura que se aplica. Por efecto de la temperatura, los puentes de hidrógeno intermoleculares se rompen y la estructura cristalina del gránulo de almidón se altera,



pasando a un estado amorfo, es decir, adopta una estructura más desorganizada. Al no existir puentes de hidrógeno intermoleculares, el gránulo de almidón tiene puntos de unión libres que usa para unirse a las moléculas de agua. De esta manera, los gránulos se hinchan, porque han absorbido agua, contribuyendo al aumento de la consistencia de la masa y de su viscosidad. La alta viscosidad conlleva a que el extrusor aplique más energía mecánica (SME), haya más cizalla y la presión sea mayor, cosa que afectará a la expansión (Leonard et al., 2019). Sin embargo, el proceso termo mecánico de extrusión incide en las propiedades nutricionales finales del extruido, siendo notoria la pérdida de aminoácidos y, en particular, de lisina (Dussan-Sarria et al. 2019).

#### **2.2.14. Producción de granos fortificados**

Para producir granos fortificados mediante extrusión, la masa se elabora a partir de harina de arroz no fortificada, una mezcla de vitaminas y minerales, agua y vapor, luego, la masa se procesa a través de una extrusora, en forma de un producto similar a un grano que se asemeja al grano de arroz y luego secados, estos granos fortificados se mezclan con arroz blanqueado en varias proporciones, la fabricación de estos granos se realiza a través de la extrusión en caliente, tibia y/o fría. La extrusión en caliente es cuando la extrusora es a temperaturas bastante altas (ligemente por encima de 100 °C); La extrusión tibia utiliza temperaturas entre 70 °C y 100 °C. La extrusión en frío es similar, excepto que utiliza una extrusora de formación simple o una prensa de pasta que no implica ningún esfuerzo adicional calor. Los granos fortificados también se pueden producir utilizando un recubrimiento resistente al enjuague, Por otra parte, algunas empresas aplican tecnología de recubrimiento resistente al enjuague a escala. (World Food Programme-WFP, 2019).

### **2.2.15. Fortificación del arroz**

La fortificación de los alimentos básicos de consumo común es una estrategia importante para reducir la carga de vitaminas y carencias minerales en una población. Múltiples estudios han establecido que, con los niveles y formas adecuadas de micronutrientes, y con la tecnología adecuada, el arroz fortificado es una intervención eficaz para mejorar los micronutrientes. Tiene el potencial de beneficiar a casi la mitad de la población mundial como la mayoría de los más de tres mil millones de personas. (De Pee, Moretti, Fabrizio, & Rosenzweig, 2018)

El arroz se puede fortificar con una amplia variedad de vitaminas y minerales, incluidos hierro, zinc y vitaminas A, B1 (tiamina), B3 (niacina), B6, B9 (ácido fólico) y B12. La fortificación del arroz que retiene los micronutrientes después de la preparación y la cocción incluye un proceso de dos pasos. Esto implica la fabricación de granos fortificados que contienen vitaminas y minerales apropiados, y luego se mezclan esos granos fortificados con arroz blanqueado para crear arroz fortificado. El tipo de fortificantes elegidos y la tecnología utilizada, garantizan que los fortificantes permanecen estables y biodisponibles en diferentes condiciones de almacenamiento, transporte, preparación y cocción. La extrusión puede producir granos fortificados que se pueden mezclar con arroz blanqueado para producir arroz fortificado que es efectivo y aceptable para consumidores en color, sabor y textura. (Milani, Montgomery, & Mejia, 2018)

La aceptabilidad y eficacia del arroz fortificado depende de la calidad de la tecnología de fortificación, del tipo y de los niveles de nutrientes añadidos y las preferencias de los consumidores. Por lo tanto, la producción de granos fortificados de calidad es un aspecto vital de los programas de enriquecimiento del arroz para garantizar un impacto positivo en

el estado de micronutrientes de las personas que consumen este producto (World Food Programme-WFP, 2019)

En el Perú el Ministerio de Salud tiene vigentes tres (03) Fichas de Homologación de Arroz Fortificado (Arroz fortificado grado extra; Arroz fortificado grado superior y Arroz fortificado grado corriente) que son de exigencia obligatoria para todas las entidades del estado, publicándose en el portal de la Central de Compras Públicas -PERÚCOMPRAS (MINSA, 2022). Asimismo, se encuentra promulgada la Ley N° 31348, Ley que propone el enriquecimiento del arroz en el Perú, la misma que dispone el enriquecimiento del arroz destinado al consumo humano directo en el país, ya sea este nacional, donado o importado, con el fin de contribuir a la disminución de la desnutrición infantil y mejorar el estado de nutrición y salud de la población en general, y actualmente se encuentra pendiente de la aprobación de su reglamentación. (Congreso de la Republica del Perú, 2021)

### 2.2.16. Grano fortificado (grano símil)

El grano fortificado (grano símil) o fortificante, es el arroz elaborado generalmente a partir de arroz partido, que ha sido sometido al proceso de extrusión tibia o caliente, se le ha adicionado las vitaminas y minerales en las cantidades indicadas en la tabla 9 y se le dado forma similar al grano de arroz. Este estará presente en un mínimo de 2% en el producto final o mezcla total (MINSA, 2022)

Tabla 9. Contenido de micronutrientes que debe tener un grano símil fortificado

Característica	Especificación	Fuente
Vitamina A, Palmitato de Vitamina A (UI)	Min. 800	
Tiamina (B1), Tiamina mononitrato (mg)	Min. 0,35	
Niacina (B3), Niacinamida (mg)	Min. 4,00	R.M. N° 564-2022/MINSA
Piridoxina (B6), Clorhidrato piridoxina (mg)	Min. 0,36	(Modificación de las Fichas de Homologación de arroz fortificado)
Folato (B9),	Min. 120	

Ácido fólico (ug)	
Cianocobalamina (B12) (ug)	Min. 0,64
Vitamina D, Vitamina D3 (ug)	Min. 1,40
Vitamina E, Tocoferol acetato (mg ET)	Min. 3,10
Hierro, Pirofosfato de hierro micronizado (mg)	Min. 4,20
Zinc, Óxido de Zinc (mg)	Min. 3,20

Fuente: (MINSA, 2022)

### **2.2.17. Implementación de procesos y equipos para producción de granos fortificados**

Los procesos para manejar las materias primas deben estar implementadas antes de iniciar el proceso de extrusión, las principales materias primas son la harina de arroz, la premezcla y el emulsionante, el arroz partido debe molerse hasta obtener una harina fina antes de mezclarlo con los demás ingredientes.

### **2.2.18. Proceso de extrusión de granos fortificados (grano símil de arroz)**

En el proceso de extrusión (ver figura 6), las materias primas se mezclan, se comprimen en una masa y finalmente se les da forma. La tecnología se basa en un sistema de tornillo que comprime la masa dentro de un tubo o barril, la calienta y luego la empuja a través de pequeñas aberturas llamados orificios de troquel. Estos orificios de troquel en forma de arroz son el primer paso para dar forma al grano fortificado masa en una forma que se asemeja a granos de arroz molidos. Al salir del orificio de la matriz, las hebras de masa se cortan en granos individuales con cuchillas giratorias. (World Food Programme -WFP, 2019)

La velocidad de rotación de las cuchillas, junto con las dimensiones de los orificios de la matriz y el rendimiento por orificio de la matriz, definen el espesor de los granos fortificados. La alta temperatura provoca cambios en la estructura de componentes como el almidón (gelatinización) y las proteínas (desnaturalización). Los granos fortificados producidos de esta manera deben transferirse al proceso posterior para su secado. Un proceso de cocción por extrusión tiene varias características clave: el dispositivo a través del cual se

alimentan las materias primas, el diseño del sistema de tornillo y su barril, las dimensiones y el número de orificios en el troquel, y el cortador y el transportador que mueven el extruido (Guy, 2001).

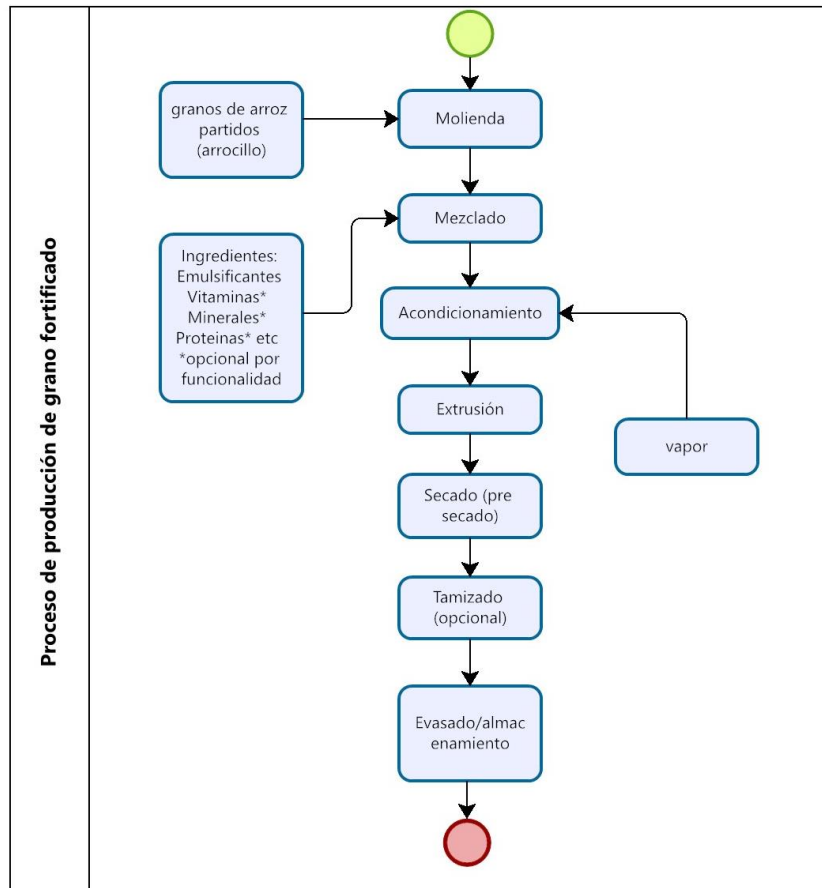


Figura 6. Proceso de producción de granos fortificados

Fuente: Adaptado de (World Food Programme -WFP, 2019)

### 2.2.19. Proceso de extrusión en tibio

En el proceso de extrusión en tibio, la temperatura de la masa en la extrusora nunca debe exceder los 100 °C, se añade agua caliente (~90°C) a la premezcla de harina y micronutrientes en un exceso de hasta el 33% y se mezcla hasta que los ingredientes se distribuyan homogéneamente (10 minutos como máximo) para simular la precocción dentro

del preconditionador. Después de mezclar, las temperaturas de la masa alcanzan los 60-62 °C; sin embargo, la temperatura de gelatinización del almidón de arroz se produce entre 65 y 78°C.

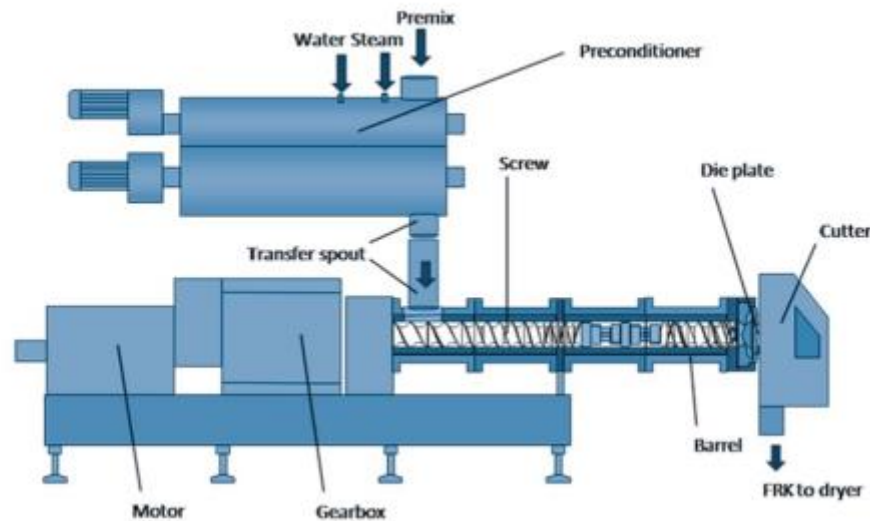


Figura 7. Esquema de una extrusora con sus componentes básicos

Fuente: (World Food Programme -WFP, 2019)

Esto se resuelve mediante un fuerte aumento de la temperatura a medida que la masa se transfiere hacia la placa de troquel, debido a la entrada de cizallamiento. La temperatura en la placa de troquel debe permanecer por debajo de la temperatura a la que los granos fortificados comienzan a expandirse ( $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para permitir la gelatinización pero evitar el inflado. La instalación de un termopar delante de la matriz permite medir la temperatura del producto y tomar medidas si es necesario. Se recomienda utilizar mecanismos de enfriamiento o ventilación en la última sección de la extrusora para evitar que las temperaturas de la masa alcancen los  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tegge, 2004)

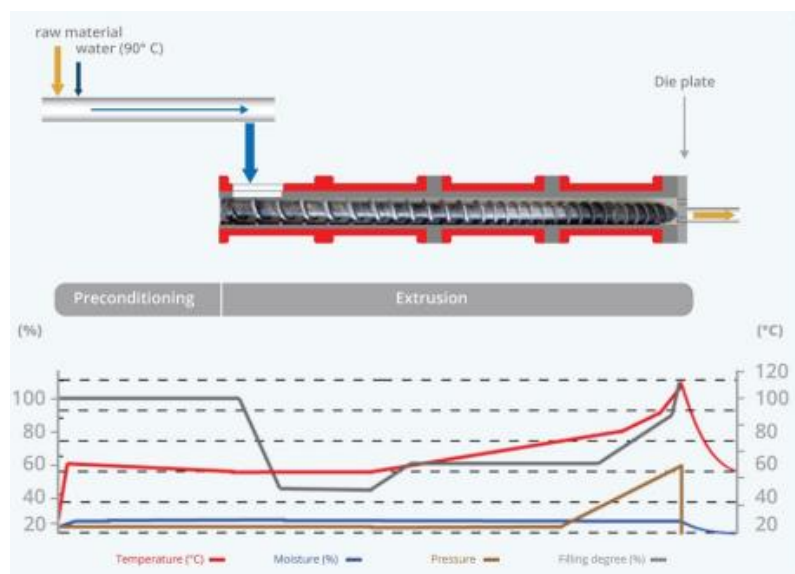


Figura 8. Esquema del proceso de extrusión en tibio

Fuente: (World Food Programme -WFP, 2019)

### 2.2.20. Parámetros operacionales de extrusión de granos fortificados

La extrusión es una operación compleja, los cambios en un parámetro del proceso, como la velocidad del tornillo, afectan a múltiples propiedades del producto y otros parámetros. Es muy importante que el operador de una línea de extrusión comprenda las correlaciones entre los cambios en los parámetros del proceso y sus efectos en las propiedades del producto. Estas correlaciones e impactos se analizan en la siguiente tabla.

Tabla 10. Parámetros operacionales de la extrusión de grano fortificados

Parámetros de proceso	Parámetros de Sistema
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros fijos</li> <li>• Tipo, tamaño y capacidad de maquina</li> <li>• Configuración de tornillos</li> <li>• Cantidad de orificios de la matriz y diámetro de apertura de los mismos</li> <li>• Preacondicionamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disipación de energía</li> <li>• Perfil de Temperatura</li> <li>• Tiempo de residencia</li> <li>• Presión antes de corte</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros variables</li> <li>• Rendimiento</li> <li>• Temperatura de alimentación</li> <li>• Adición de Agua o vapor</li> <li>• Velocidad de rotación del tornillo (rpm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros estructurales</li> <li>• Gelatinización o degradación del almidón</li> <li>• Texturización o degradación de la proteína</li> <li>• Ingredientes: vitaminas, minerales, grasa, emulsificantes:</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura interna del conducto de extrusión</li> <li>• Ventilación</li> <li>• Velocidad de corte</li> <li>• Preacodicionamiento</li> <li>• Temperatura</li> <li>• Tiempo de retención</li> <li>• Adición de agua, vapor o otros líquidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción, desnaturalización, encapsulación y compresión.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propiedades de la materia prima</li> <li>• Harina de arroz, tipo, proporción de amilosa y amilopectina</li> <li>• Contenido de grasa, humedad, proteína</li> <li>• Adición de componentes, vitamina, minerales, emulsificante</li> <li>• Calidad y homogeneidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros del producto</li> <li>• Calidad:</li> <li>• Forma</li> <li>• Densidad</li> <li>• Color</li> <li>• Textura</li> <li>• Gusto</li> <li>• Agrietamiento</li> <li>• Actividad de agua</li> </ul>

Fuente: Adaptado de (WFP, World Food Programme, 2019)

### 2.2.21. Calidad de los granos fortificados

La calidad de los granos fortificados depende de muchos factores (Tabla 11). Un factor importante es el tipo de harina de arroz utilizada, ya que las harinas se comportan de manera diferente durante el proceso. Además, el tipo de equipo utilizado tiene un impacto en las características finales. Por último, los ajustes de los parámetros de extrusión son tan decisivos, como la materia prima y el equipo.

Tabla 11. Requisitos de calidad de un grano fortificado

Parámetro de calidad	Descriptor
<b>Apariencia similar al arroz" y tamaño</b>	El grano fortificado debe parecerse lo más posible al arroz no fortificado con el que se mezclará. La apariencia varía mucho según la región y se define en términos de longitud, ancho, diámetro, blancura y translucidez. (esto debe regirse a la normativa vigente que regula la producción de arroz)
<b>Contenido de humedad</b>	El contenido de humedad debe estar entre el 10 y el 14%. Si el contenido es mayor, existe el riesgo de contaminación por hongos. Si el contenido es menor, los granos pueden agrietarse.
<b>Contenido de micronutrientes y otros ingredientes</b>	Debido a las pérdidas durante la fase de producción y durante el almacenamiento el contenido de micronutrientes y otros ingredientes deben



	<p>ser sobre dosificados durante la mezcla, de modo que su importe final en el grano fortificado cumpla con los requisitos solicitados.</p> <p>La prueba del contenido del nutriente fortificante debe ser realizada aleatoriamente por el cliente a través de la contratación de un laboratorio de análisis.</p>
<b>Vida útil</b>	<p>La vida útil está muy influenciada por el material de envasado, el contenido de humedad y el grado de cocción (el almidón muy cocido aumentará la vida útil). Es recomendable realizar un análisis de la vida útil de su producto a través de un proveedor de servicios analíticos capaz de determinar el contenido de nutriente fortificante a lo largo del tiempo a temperaturas representativas de las condiciones de almacenamiento</p>
<b>Comportamiento culinario</b>	<p>El comportamiento de cocción se refiere a la estabilidad de los granos durante la cocción. Durante la cocción, parte de los granos pueden disolverse. Si el arroz se cocina con exceso de agua (es decir, el agua de cocción se vierte antes de servir), estos micronutrientes se pierden. Por lo tanto, los productores deben aspirar a que menos del 10% de los granos fortificantes se disuelva durante la cocción.</p>
<b>Distribución de tamaños del grano</b>	<p>La diferencia de tamaño entre el grano fortificado más grande y el más pequeño debe estar dentro del mismo rango que se produce naturalmente en el arroz que se va a mezclar con grano fortificado. Si este no es el caso, puede producirse una desagregación en las bolsas durante el transporte del arroz fortificado. Esto causará diferencias en los niveles de consumo de grano fortificado.</p>

Fuente: (World Food Programme-WFP, 2019)

### 2.2.22. Arroz Fortificado.

Es el Arroz blanco (pilado) o arroz añejo de la variedad *Oryza sativa* L, inocuo y adecuado para el consumo humano, del cual se ha eliminado, parcial o totalmente por elaboración, el salvado y el germen; y ha sido mezclado con el grano símil o fortificante que contiene las vitaminas y minerales, obtenidos por extrusión en tibio o caliente. Las Especificaciones Técnicas que debe cumplir se establecen en la R.M. N° 564-2022/MINSA (Modificación de las Fichas de Homologación de Arroz fortificado) de las cuales se destacan contenido de humedad máximo 14%, presencia de grano símil mínimo del 2%,

características de sanidad y aspecto por grado de calidad, características nutricionales y límite de contaminantes (PNAEQW, 2023)

### 2.2.23. Precio de mercado del Arroz Fortificado.

El precio de venta del Arroz fortificado es variable y está en función de muchas variables de la cadena de abastecimiento. Sin embargo, tomando en consideración la entidad de mayor requerimiento de arroz fortificado en el Perú la cual establece los valores en moneda peruana en la siguiente Tabla.

Tabla 12. Comparativo de precios del arroz y arroz fortificado en el 2022 y 2023.

Alimento	Servicio Alimentario	Servicio alimentario	% de Variación
	2022	2023	
	Precio por kg*	Precio por kg*	
Arroz (**)	S/. 3.35	S/. 3.43	3%
Arroz fortificado (***)	S/. 3.71	S/. 3.82	3%

(\*) Precio promedio obtenido de facturas de compra de proveedores del PNAEQW

(\*\*) ~ 44,908 toneladas entregados en servicio alimentario del PNAEQW en el 2022

(\*\*\*) ~ 42,997 toneladas entregados en servicio alimentario del PNAEQW en el 2022

Fuente: (PNAEQW- UOP- CCA, 2023)

### 2.2.24. La malnutrición

En la actualidad, los problemas de salud pública asociados con la nutrición se presentan tanto por desequilibrios en la ingestión proteico-calórica (obesidad, hipercolesterolemia, desnutrición crónica, marasmo, etc.) como debido a posibles deficiencias en minerales y vitaminas (anemias, osteoporosis, bocio, etc.), que afectan de forma diversa tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El Perú no es ajeno a esta problemática, pues en el país aún se encuentran problemas de malnutrición por déficit, desnutrición crónica y anemia ferropénica, principalmente en el ámbito rural; mientras que

la malnutrición por exceso como el sobrepeso y la obesidad, se concentra en el ámbito urbano (CENAM, 2015)

Según FAO (2022), la desnutrición es la condición fisiológica anormal debido a una ingesta insuficiente, desequilibrada o excesiva de macronutrientes o micronutrientes. La desnutrición incluye no solo el sobrepeso y la obesidad, sino también las deficiencias nutricionales (infancia retrasada y emaciada, deficiencias de vitaminas y minerales).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Diseño experimental**

En este trabajo se desarrolló en 2 fases:

**Fase 1:** Hidrólisis enzimática de anchoveta peruana entera (*Engraulis ringens*) con las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089: Evaluación del efecto de las variables de concentración enzimática, cantidad de sustrato y tiempo de reacción a una temperatura estándar de 60°C para la determinación de sus valores óptimos sobre las variables respuesta.

El hidrolizado obtenido con los parámetros optimizados se deshidrató hasta obtener un concentrado proteico hidrolizado según proceso productivo controlado implementado por COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.

**Fase 2:** Formulación de un extruido (grano fortificado o símil de arroz): Sustitución parcial de harina de arroz por concentrado proteico hidrolizado (optimizado en la fase 1) y aditivo, para determinar los porcentajes de sustitución óptimos en la formulación del grano símil de arroz en función a las variables respuesta.

#### **3.2. Variables e indicadores de la investigación**

##### **a) Variables independientes - fase 1**

- **Concentración de Enzima;** concentración de Corolase 7089 + Corolase 8000, expresada en gramos / 100g sustrato].
- **Concentración de sustrato;** cantidad de anchoveta entera triturada expresada en porcentaje (% p/p) [gramo de anchoveta/L de agua\*100].
- **Tiempo de reacción;** Es el tiempo cuantificado a partir de la adición de la enzima sobre el sustrato hasta el inicio de la inactivación de la misma.

**b) Variables dependientes (respuesta) - fase 1**

- **Brix no corregido (°Bx ref.)** Expresado en grados Brix, es un indicador que mide la cantidad de sólidos soluble obtenidos producto de hidrolisis la proteína.
- **Porcentaje solidos insolubles (%SI):** Es un indicador que mide la cantidad de sólidos insolubles presentes en el alimento expresados en porcentaje (%).
- **Porcentaje de grasas (%G):** Es un indicador que mide la cantidad de grasa presentes en el alimento expresados en porcentaje (%), generada producto de la hidrolisis de la proteína.

En la Tabla 13 se muestran los niveles de estudio donde se indican los rangos de concentración de enzimas, sustrato y tiempo de reacción en los experimentos. Estos valores fueron establecidos en base a la información obtenida de las Fichas Técnicas de las enzimas comerciales (Anexo 1) y datos preliminares otorgados por el Laboratorio de Calidad e Investigación de la empresa COLPEX INTERNATIONAL S.A.C. sede Chimbote.

Tabla 13. Niveles de estudio para los experimentos de Hidrólisis Enzimática de Anchoveta

Factor	Dimensión	Código	Nivel		
			Mínimo (-1)	Central (0)	Máximo (+1)

Enzima 1	g (g enzima/100 g proteína cruda)		0.04	0.06	0.08
Enzima 2	g (g enzima/100 g proteína cruda)		0.16	0.24	0.32
Enzima	g (g enzima 1+g enzima 2/100 g proteína cruda)	X1	0.2	0.3	0.4
Sustrato	% (g pescado/L agua)	X2	0.45	0.5	0.55
Tiempo de reacción	Minutos	X3	30	45	60

Los experimentos de hidrólisis fueron realizados según el plan experimental establecido en la Tabla 14, el cual se diseñó de acuerdo al modelo factorial de Box-Behnken en el software DESING EXPERT 13, obteniéndose un planeamiento factorial 2k que incluye doce (12) puntos factoriales y tres (03) puntos centrales con un total de 15 experimentos.

Posteriormente se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para estudiar el efecto de las variables y determinar los valores óptimos que maximicen los grados Brix referencial ( $^{\circ}\text{Bx ref}$ ) tomando como límite  $8^{\circ}\text{Bx ref}$  y minimicen el Porcentaje de sólidos insolubles(%SI) y Porcentaje de grasa (%G); según un perfil de deseabilidad compuesto.

Finalmente, los parámetros óptimos de Concentración de Enzimas, sustrato y tiempo de reacción determinados en la etapa anterior fueron validados mediante ensayos de Hidrólisis Enzimática de Anchoqueta a condiciones óptimas y comparados con los valores respuesta de la predicción estadística del modelo matemático obtenido en el Software DESING EXPERT 13.

Tabla 14. Diseño experimental factorial Modelo de Box-Behnken para los ensayos experimentales de hidrólisis enzimática de Anchoqueta peruana.

Experimento	Codificado	Reales
-------------	------------	--------

	<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>X3</b>	<b>Enzima (g/100g sustrato)</b>	<b>Sustrato (%)</b>	<b>Tiempo de reacción (min)</b>
1	-1	-1	0	0.2	0.45	45
2	0	0	0	0.3	0.5	45
3	-1	1	0	0.2	0.55	45
4	0	-1	1	0.3	0.45	60
5	0	1	1	0.3	0.55	60
6	1	0	-1	0.4	0.5	30
7	0	1	-1	0.3	0.55	30
8	1	1	0	0.4	0.55	45
9	0	-1	-1	0.3	0.45	30
10	1	-1	0	0.4	0.45	45
11	-1	0	1	0.2	0.5	60
12	1	0	1	0.4	0.5	60
13	0	0	0	0.3	0.5	45
14	0	0	0	0.3	0.5	45
15	-1	0	-1	0.2	0.5	30

La concentración de enzimas se trabajó en combinación de las mismas de acuerdo a lo detallado en la siguiente tabla:

Tabla 15. Concentración de enzima utilizada para cada tratamiento

<b>Experimento</b>	<b>Enzima 1-E<sub>1</sub> (Corolase 7089) (g/100g sustrato)</b>	<b>Enzima 2- E<sub>2</sub> (Corolase 8000) (g/100g sustrato)</b>	<b>Enzima (%) <math>\Sigma E_1, E_2</math></b>
1	0.04	0.16	0.2
2	0.06	0.24	0.3
3	0.04	0.16	0.2
4	0.06	0.24	0.3
5	0.06	0.24	0.3
6	0.08	0.32	0.4
7	0.06	0.24	0.3
8	0.08	0.32	0.4
9	0.06	0.24	0.3
10	0.08	0.32	0.4
11	0.04	0.16	0.2
12	0.08	0.32	0.4

13	0.06	0.24	0.3
14	0.06	0.24	0.3
15	0.04	0.16	0.2

Para llevar a cabo la fase 1 de la investigación se aplicó una estrategia de trabajo que se describe en la siguiente figura:

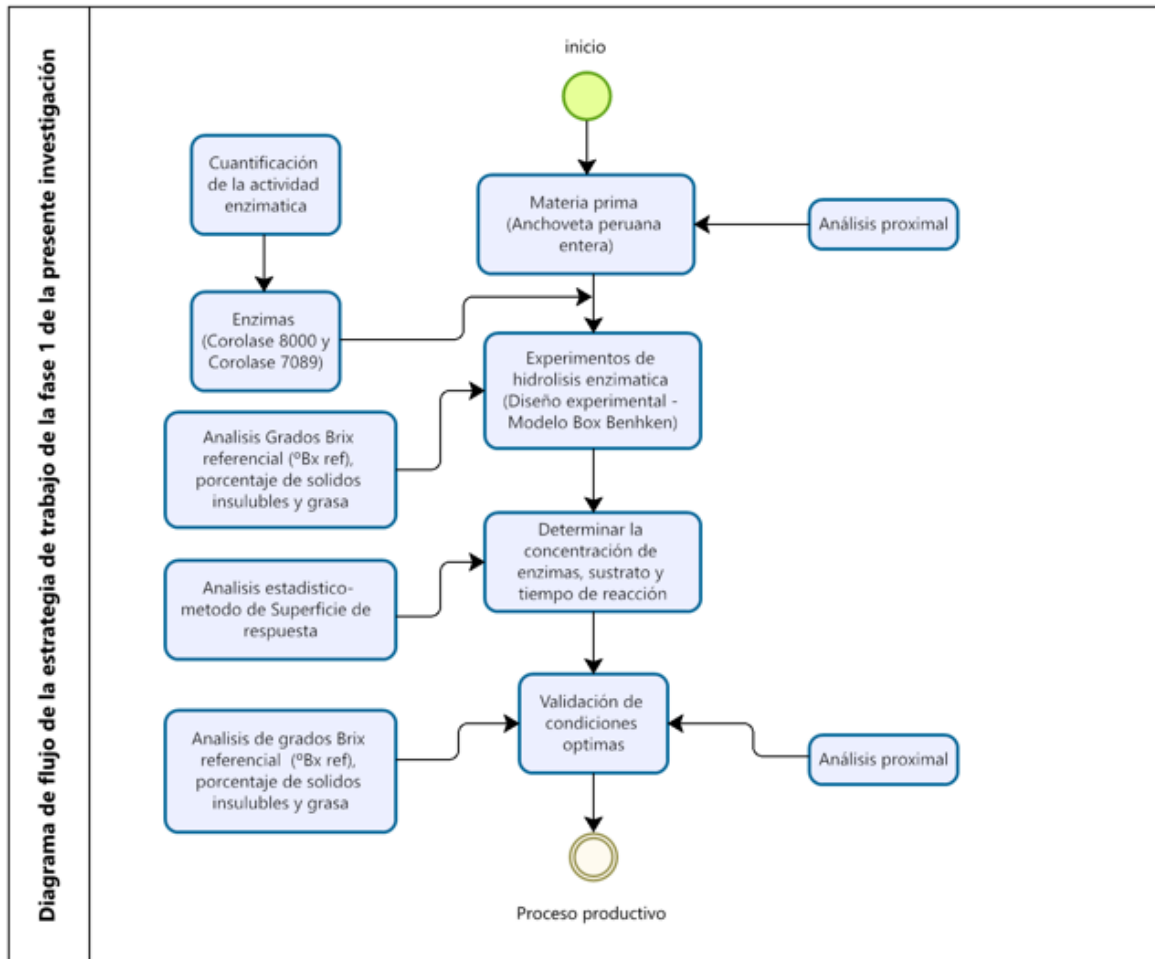


Figura 9. Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la fase 1 de la investigación

### c) Variables independientes - fase 2

- **Porcentaje de sustitución:** Es el porcentaje de concentrado proteico hidrolizado de anchoveta que sustituye parcialmente a la harina de arrocillo en la formulación del extruido (grano símil de arroz), expresada en porcentaje (% p/p) en base al

peso total de la harina de arrocillo utilizada en la formulación, [gramo de concentrado proteico hidrolizado/peso total de harina de arrocillo \* 100].

- **Porcentaje de aditivo (E471):** Es el porcentaje de aditivo adicionado en la formulación del extruido expresada en porcentaje (% p/p) en base al peso total de harina de arrocillo utilizada en la formulación, [gramo de aditivo /peso total de harina de arrocillo\* 100].

#### **d) Variables dependientes (respuesta) - fase 2**

**Contenido proteico (%P):** Es la cantidad de proteína presente en el extruido de obtenido, expresada como el porcentaje (%) de proteína presente en base a 100gr.

**Perdida por cocción (%PC):** Es la diferencia porcentual de peso que pierde el alimento extruido al ser sometido a cocción en agua por un determinado tiempo, se expresa como porcentaje peso en peso (% p/p) de muestra.

**Grado de similitud al grano de arroz (°S):** Es el resultado de la evaluación sensorial (aspecto) evaluada en una escala hedónica de 1 a 9 de menor a mayor similitud.

En la Tabla 16 se muestran los niveles de estudio donde se indican los rangos de porcentaje de concentrado proteico hidrolizado y porcentaje de aditivo en los experimentos. Estos valores fueron establecidos en base a la información obtenida de la evaluación de normativa, estudios y datos preliminares otorgados por el Laboratorio de Calidad e Investigación de la empresa INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC planta ubicada Calle Los Cerezos Mz G Lt 05 Urb. Lotiz Chillón-Puente Piedra Lima.

Tabla 16. Niveles de estudio para los experimentos de formulación del extruido (grano símil de arroz).



Factor	Dimensión	Código	Nivel		
			Mínimo	Central	Máximo
			(-1)	(0)	(+1)
Concentrado proteico hidrolizado de anchoveta entera (%)	%	X <sub>1</sub>	5	17.5	30
Aditivo (E471)	%	X <sub>2</sub>	0.1	0.15	0.2

Los experimentos fueron realizados según el plan experimental establecido en la Tabla 17, el cual se diseñó de acuerdo al modelo factorial de  $2^k$  en el software DESING EXPERT 13, obteniéndose un planeamiento factorial  $2^k$  que incluye ocho (8) puntos factoriales y cuatro (04) puntos centrales con un total de 12 experimentos.

Posteriormente se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para estudiar el efecto de las variables y determinar los valores óptimos que maximicen el contenido de proteína (%) y el grado de similitud respecto al grano de arroz y minimicen la pérdida por cocción (%).

Finalmente, los parámetros óptimos de porcentaje de concentrado proteico hidrolizado (%) que sustituye la harina de arroz (arrocillo) y el porcentaje de aditivo obtenidos en la etapa anterior fueron validados mediante proceso productivo de acuerdo a los parámetros fijos de producción de grano símil implementado por INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC. y comparados con los valores respuesta de la predicción estadística del modelo matemático obtenido en el Software DESING EXPERT 13.

Tabla 17. Diseño experimental factorial  $2^k$  para los ensayos experimentales para los experimentos de formulación del extruido (grano símil de arroz).

Tratamiento	Codificado		Reales	
	X1	X2	Concentrado proteico hidrolizado de anchoveta entera en polvo (%)	Aditivo E471 (%)
<b>1</b>	1	1	30	0.2
<b>2</b>	0	-1	17.5	0.1

3	0	0	17.5	0.15
4	0	0	17.5	0.15
5	-1	0	5	0.15
6	-1	1	5	0.2
7	0	0	17.5	0.15
8	1	0	30	0.15
9	1	-1	30	0.1
10	-1	-1	5	0.1
11	0	1	17.5	0.2
12	0	0	17.5	0.15

Para la fase 2, se aplicó la estrategia de trabajo descrita en la siguiente figura:

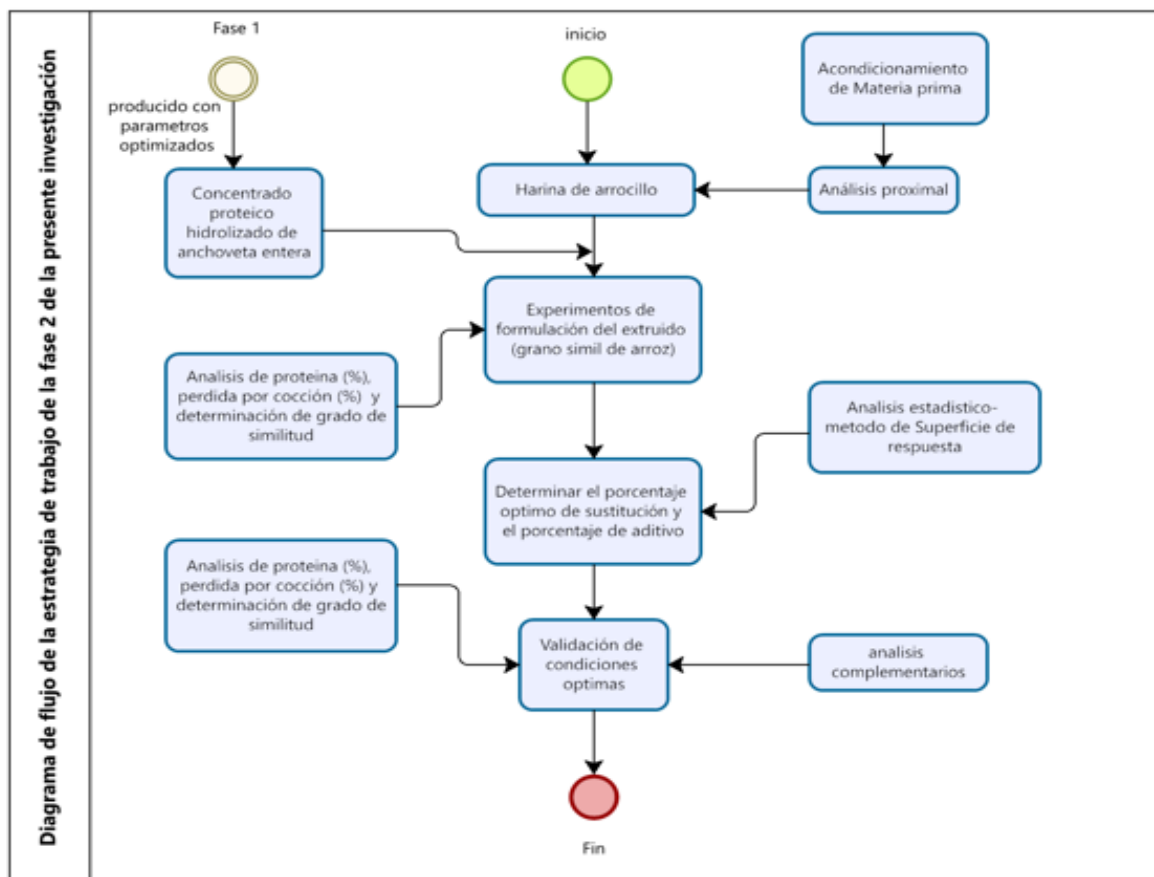


Figura 10. Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo de la fase 2 de la investigación

### 3.3. Materia prima e insumos utilizados

#### 3.3.1. Materia prima:

- **Anchoveta peruana** en etapa adulta con tamaño mayor de 12 cm (datos de ictiometría otorgada por el Laboratorio de Calidad e Investigación de COLPEX INTERNATIONAL S.A.C. - Chimbote), fue adquirida de una fuente comercial de pesca artesanal local en el mes de diciembre de 2022. La muestra fue lavada cuidadosamente y acondicionada para los experimentos de hidrólisis enzimática. La composición química de la materia prima se determinó por el contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína (análisis proximal).
- **Arroz partido (arrocillo)** despedrado y sometido a selector óptico para retirar restos de granos tizosos, verdes u otros, adquirido de un proveedor autorizado, adquirido por INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC. La muestra fue sometida a molienda. La composición química de la materia prima se determinó por el contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína (análisis proximal).

### 3.3.2. Insumos:

- **Enzimas comerciales**

El proceso de hidrólisis enzimática de proteína de anchoveta peruana se realizó con la acción conjunta de dos (02) proteasas comerciales (Tabla 18). Estas enzimas fueron otorgadas por el Laboratorio de Calidad e Investigación de COLPEX INTERNATIONAL S.A.C. - Chimbote para los fines del estudio. Las enzimas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 (AB Enzymes) son concentrados enzimáticos microbianos (endo-serina y metalo serina proteasas) de origen fúngico (Termocolina de *Trichoderma reesei*) y bacteriano (*Bacillus subtilis*), respectivamente.

Se cuantificó la Actividad Enzimática de estas proteasas en condiciones de pH 6.2 (simulando el pH que se utilizó para la hidrólisis de anchoveta peruana) y una temperatura de 60°C establecida como parámetro fijo del proceso.

Tabla 18. Datos de fichas técnicas de proteasas comerciales.

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

Fuente: Elaboración propia a partir de fichas técnicas de enzimas (AB Enzymes)

- **Aditivo (E471)**

El proceso de extrusión requirió acción conjunta de los insumos adicionados en la formulación, de los cuales el aditivo código SIN 471 denominado Monoglicéridos y Diglicéridos de Ácidos Grasos de clase funcional: Antiespumante, emulsionante, agente de glaseado y estabilizador fue proporcionada por el Laboratorio de Calidad e Investigación de INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C. para los fines del estudio.

### 3.4. Proceso de hidrólisis enzimática

Todos los experimentos de hidrólisis detallados en la Tabla 14 se realizaron en un bioreactor de 3L (Modelo Ez2-control - Aplikkon). Previamente, la materia recepcionada directamente de la cadena de abastecimiento de materia prima de COLPEX INTERNATIONAL S.A.C., Posteriormente se trituró y se mezcló con agua destilada en una dilución de sustrato de acuerdo a los tratamientos de la investigación basado en la metodología empleada por COLPEX INTERNATIONAL S.A.C. Los experimentos se realizaron en batch con un peso total de 1kg de mezcla de reacción.

La reacción de hidrólisis se realizó sin ajuste inicial del pH con un valor de  $6.2 \pm 0.2$  (pH de la mezcla de Anchoveta peruana y agua), y con una velocidad de agitación constante de 200 rpm durante un tiempo total de 60 minutos. Previamente la mezcla de reacción se precalentó hasta la temperatura específica del experimento en un equipo de baño maría y se añadió al vaso del biorreactor, donde se estabilizó la temperatura y se inició la hidrólisis adicionando las concentraciones de ambas enzimas. La temperatura se mantuvo constante a  $60^{\circ}\text{C}$  mediante el sistema de calentamiento equipado en el biorreactor, mientras que el pH no se ajustó a lo largo del proceso.

Transcurrido el tiempo de reacción según tratamiento, el hidrolizado se filtró a través de una gasa simple para separar las espinas y residuos, y se realizó la inactivación enzimática a una temperatura de  $87 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos en un equipo de baño maría. Las muestras de cada tratamiento se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos posterior a ello se midió los °Brix referencial del sobrenadante (fracción soluble) y porcentaje de sólidos insolubles y porcentaje de grasa.

Luego de haberse obtenido los parámetros óptimos de hidrólisis mediante la metodología de superficie de respuesta, se validó estos parámetros a escala industrial tomando como base 1 tonelada de anchoveta entera según proceso productivo implementado por COLPEX INTERNATIONAL S.AC. (proceso productivo detallado en el Anexo 2).

### **3.5. Proceso de extrusión**

Todos los experimentos de formulación del extruido (grano símil de arroz) detallados en la Tabla 17 se realizaron en un extrusor de doble tornillo (Modelo EDDT-200 Marca JINAN DATON MAQCHINERY CO.LTD). Previamente, El arroz partido (arrocillo) fue adquirido por INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C. y sometido a molienda en una empresa prestadora de servicios. La mezcla de harina de arrocillo con concentrado

proteico hidrolizado de anchoveta entera obtenido con los parámetros óptimos obtenidos en la fase 1 de la presente investigación en adición del aditivo se acondicionan según las formulaciones establecidas en la Tabla 17 e ingresaran al equipo de extrusión previo mezclado homogéneo a una humedad fija de la mezcla de alimentación de 25.4. Los parámetros de proceso de extrusión se fijaron conforme procedimiento operativo para la producción de grano símil que tiene implementado INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C.

Transcurrido el proceso de extrusión según tratamiento, el extruido obtenido (grano símil de arroz) fue sometido a un proceso de secado, a una temperatura de 60°C durante 30 minutos en un equipo de secado. Las muestras de cada tratamiento se enfriaron y envasaron en la zona de envasado para su posterior análisis de contenido de proteína, pérdida por cocción y evaluación de grado de similitud.

Luego de haberse obtenido los parámetros óptimos formulación según diseño estadístico de superficie respuesta, se procesó utilizando estos parámetros a escala industrial tomando como base 200 kg de harina de arrocillo según proceso productivo implementado por INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C.

### **3.6. Métodos analíticos**

#### **3.6.1. Caracterización de materia prima e insumos**

a) **La caracterización fisicoquímica de la Anchoveta entera** se realizó mediante la determinación del contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína cruda según los procedimientos estandarizados del Laboratorio de Calidad e Investigación (COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.), los cuales están basados en los siguientes métodos.

- Determinación de Humedad: Referencia ISO 1442: 1997
- Determinación del contenido de grasa: Referencia NTP 201.016:2002 (revisada el 2022)

- Determinación de Cenizas: Referencia NTP 201.022:2002 (revisada el 2022)
- Determinación de proteína cruda: Referencia NTP 201.021:2002 (revisada el 2022)

Todos los análisis fueron realizados por triplicado

**b) La caracterización fisicoquímica de harina de arrocillo** se realizó mediante la determinación del contenido de humedad, ceniza, grasa, proteína cruda, tamaño de partícula según los procedimientos estandarizados del Laboratorio de Calidad e Investigación (INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C.), los cuales están basados en los siguientes métodos.

- Determinación de Humedad: Referencia NTP 205.037:2022
- Determinación del contenido de grasa: Referencia NTP 205.041:2022
- Determinación de Cenizas: Referencia NTP 205.038:2022
- Determinación de proteína total: Referencia NTP 205.005: 2018
- Determinación de tamaño de partícula: Referencia NTP-ISO 5223:2017 (revisada el 2022)

Todos los análisis fueron realizados por triplicado

**c) La caracterización fisicoquímica y microbiológica del concentrado proteico hidrolizado** se realizó mediante la contratación de un Laboratorio de ensayo acreditado ante el INACAL-DA para realizar los análisis fisicoquímicos (humedad, grasa, proteínas, ceniza, digestibilidad, histamina, cloruros, densidad aparente, densidad compactada, TBVN, tamaño de partícula, acidez), Microbiológicos (Enterobacterias, levaduras, *Listeria monocytogenes*, mohos y *Salmonella*), Metales pesados (Arsénico, cadmio, plomo, mercurio, flúor), Perfil de Aminoácidos y micronutrientes (sodio, potasio, hierro, fosforo, magnesio, cromo y molibdeno).

La metodología que utilizó el laboratorio acreditado se describe a continuación:

- Determinación de Humedad según (NTP-ISO 6496, (Revisada el 2022)).

- Determinación del contenido de grasa según (NTP 204.033:1985 (Revisada el 2010))
- Determinación de Cenizas según (AOAC 942.05, 2019)
- Determinación de proteína total según (NTP ISO 5983:2002 (revisada el 2018))
- Determinación de histamina según (NCh 2637:2001 (Modificado el 2021))
- Determinación de digestibilidad a la pepsina según (AOAC, 1999)
- Determinación de densidad aparente y compacta según (ISP, 2020)
- Determinación de tamaño de partícula según (NTP 201.032:1982 (Revisado 2015))
- Determinación de tamaño de cloruros según (AOAC 937.09)
- Determinación de tamaño de acidez según (Communities, 2012)
- Cuantificación de Enterobacterias según (ICMSF, 2000)
- Cuantificación de levaduras y mohos (ICMSF, 2000)
- Cuantificación de *Listeria monocytogenes* según (FDA7BA, 1998)
- Cuantificación de *Salmonella* según (ISO 6579-1:2017)
- Cuantificación de metales pesados (arsénico, cadmio, plomo, mercurio) según (AOAC Official Method, 2016)
- Cuantificación de metales pesados (flúor) según (AOAC 975.08, 2019)
- Cuantificación de Micronutrientes según (Inductively Coupled Plasma, 1994)
- Determinación del perfil de aminoácidos según (ISO 13903:2005)

### **3.6.2. Cuantificación de actividad enzimática**

Para la determinación de la actividad enzimática proteasa (AEP) de las enzimas comerciales se utilizó el método de Cuantificación de Actividad Proteasa utilizando Caseína como Sustrato (Cupp-Enyard, 2008), con modificaciones para simular las condiciones de pH en la cual se realiza la hidrólisis del pescado (pH ~6.2). Se



empleó un Buffer Fosfato (pH 6.2) en la preparación de la solución de caseína 0.65% p/v. Los ensayos se realizaron con una dilución de enzimas 1:4000 (v/v) durante 10 minutos a las temperaturas de 50, 60 y 70 °C. La curva de calibración se elaboró con el aminoácido L-tirosina. La actividad enzimática se definió con la unidad (U) como la cantidad de Tirosina-equivalentes ( $\mu\text{mol}$ ) liberados de la caseína por minuto en las condiciones específicas del ensayo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.6.3. Determinación de grados Brix referenciales**

Para determinar los grados Brix referenciales en muestras de hidrolizado (fracción soluble) se empleó el método utilizado por (Roldán et al., 2021). La determinación del grado Brix no corregido ( $^{\circ}\text{Bx ref.}$ ) fue directa a temperatura ambiental ( $21 \pm 1$  °C) (Sugar Refractometer model RHB rango 0 - 80 °Brix, Alemania). Como Blanco se utilizó una muestra inicial recolectada previamente a la adición de las enzimas en el experimento de hidrólisis enzimática.

Al hidrolizado obtenido utilizando con las variables optimizadas según método estadístico de superficie de respuesta el valor obtenido en  $^{\circ}\text{Brix ref.}$  se determinó el El grado de hidrólisis (GH%) siguiendo el procedimiento realizado por (Roldán et al., 2021). La metodología se detalla en el Anexo 03

Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6.4. Determinación de porcentaje de solidos insolubles**

La determinación de solidos insolubles se determinó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y se calculó en función del peso total de hidrolizado y la fracción de solidos insolubles separados por centrifugación, para determinar el porcentaje de solidos insolubles (%SI) se utilizó la siguiente formula.

$$\%SI = \frac{\text{Peso de la fracción de sólidos insolubles}}{\text{Peso total de hidrolizado}} \times 100 \text{ [Eq. 2]}$$

Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6.5. Determinación de porcentaje de grasa**

La determinación de grasa se determinó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y se calculó en función del peso total del hidrolizado y la fracción de grasa separada por centrifugación, para determinar el porcentaje de sólidos insolubles (%G) se utilizó la siguiente fórmula.

$$\%G = \frac{\text{Peso de la fracción de grasa}}{\text{Peso total de hidrolizado}} \times 100 \text{ [Eq. 3]}$$

Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6.6. Determinación de proteína en el extruido (grano similar de arroz)**

La determinación de proteína total se realizó según lo establecido en la Norma Técnica Peruana NTP 205.005: 2018 CEREALES Y MENESTRAS. Cereales. Determinación de proteínas totales (método de Kjeldahl). Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6.7. Determinación de pérdida por cocción en el extruido (grano similar de arroz)**

La determinación de pérdida por cocción se realizó según la metodología establecida por la (AACC, 1999), la cual se describe en el Anexo 04

Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6.8. Determinación de grado de similitud en el extruido (grano similar de arroz)**

La determinación del grado de similitud se realizó utilizando una escala de intervalo de 1 a 9 puntos (Ramírez-Navas, 2012), a los panelistas entrenados se les pidió evaluar muestras codificadas por tratamiento frente a un patrón (grano de arroz pilado),

indicando un valor numérico cada muestra, en una escala que evaluó el grano de similitud del extruido (grano símil) frente al grano de arroz pilado (en función de forma, longitud y espesor), empleándose una escala no estructurada que determina la intensidad de la similitud en un rango de 1 a 9, donde 1 es menor similitud y 9 es el valor que representa mayor similitud. Los análisis se realizaron por triplicado (ver Anexo 9).

### **3.6.9. Determinación de calidad del extruido (grano símil de arroz) obtenido con formulación optimizada.**

#### **a) Determinación de Vida útil**

Teniendo en cuenta una temperatura ambiente entre 20 a 25°C de almacenamiento en tiempo real del extruido (grano símil de arroz enriquecido con péptidos de anchoveta), para este estudio se expuso al producto a la temperatura extrema de 43±1°C, el cual tiene una diferencia de 20°C aproximadamente a lo real. La vida útil se evaluó en función a las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales del alimento.

Para la determinación de las características microbiológicas se tomó como referencia el criterio V.7 Productos instantáneos extruidos o expandidos proteinizados o no y hojuelas a base de granos (gramíneas, quenopodiáceas y leguminosas) que no requieren cocción establecidos en (NTS N°71-MINSA/DIGESA, 2008) aprobada mediante la Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA.

Tabla 19. Criterios microbiológicos considerados para evaluación de vida útil del grano símil enriquecido con péptidos de anchoveta

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gramo	
					m	M
Aerobios mesófilos	3	3	5	1	104	105
Mohos	2	3	5	2	102	103

Coliformes	5	3	5	2	10	102
Bacillus cereus	8	3	5	1	102	103
Salmonela sp	10	2	5	0	Ausencia /25g	---

Criterio V.7 Productos instantáneos extruidos o expandidos proteinizados o no y hojuelas a base de granos (gramíneas, quenopodiáceas y leguminosas) que no requieren cocción- Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA.

Para la determinación de características fisicoquímicas, se toma en cuenta los descriptores de calidad estandarizados por INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C. los cuales fueron humedad y acidez titulable. La determinación de estos análisis se realizó según NTP 209.264:2018 y NTP 209.266:2012 (revisada el 2021), respectivamente.

Para la determinación de características sensoriales se toma en cuenta los descriptores estandarizados por INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC para el producto, los cuales fueron aspecto, color, olor y sabor. La determinación de los análisis sensoriales se realizó conforme lo establecido en el (NTP-ISO 4121:2008 (revisada el 2019))

### 3.7. Análisis Estadístico

#### a) Para la fase 1: Proceso de hidrolisis enzimática

Los datos recolectados de las respuestas del Diseño Experimental Modelo Box-Benhken aplicado en este estudio fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para esto se empleó el Software estadístico DESING EXPERT 13. Se aplicó el método de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización de los parámetros de estudio mediante el Perfil de Deseabilidad Compuesto donde se determinaron los valores de maximización y minimización de las respuestas.

## **b) Para la fase 2: Formulación del extruido (Grano símil de arroz)**

Los datos recolectados de las respuestas del Diseño Experimental Modelo  $2^k$  aplicado en este estudio fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para esto se empleó el Software estadístico DESING EXPERT 13. Se aplicó el método de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización de los parámetros de estudio mediante el Perfil de Deseabilidad Compuesto donde se determinaron los valores de maximización y minimización de las respuestas.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA FASE 1 DE LA INVESTIGACIÓN**

La fase 1 de la presente investigación reportó los siguientes resultados:

#### **4.1.1. Caracterización fisicoquímica de la materia prima**

La composición fisicoquímica proximal de la materia prima anchoveta (*E. ringens*) entera (incluye vísceras) que se utilizó reporto los valores mostrados en la tabla 20:

Tabla 20. Composición proximal de anchoveta entera

<b>Componente</b>	<b>Composición (% en base húmeda)</b>
Proteína cruda	17.85 $\pm$ 0.15
Humedad	75.19 $\pm$ 0.28
Ceniza	3.15 $\pm$ 0.08
Grasa	4.67 $\pm$ 0.42

Los valores de proteína y humedad fueron similares a los observados por Pariona-velarde, et al., (2020) quienes reportaron valores de proteína cruda y humedad en músculo de *E. ringens* de  $17.3 \pm 0.4\%$  y  $79.2 \pm 0.2$  respectivamente. Otro estudio utilizando anchoveta entera reportó valores entre  $19.86 \pm 0.12$  y  $18.10 \pm 0.07$  de proteínas y entre  $76.48 \pm 0.16$  y  $72.18 \pm 0.08$  de humedad (Albrecht-Ruiz & Salas-Maldonado, 2015). Estos resultados, si bien

discrepan ligeramente con lo obtenido en el presente estudio, demuestran que los factores como la estación del año, la edad del pez, el sexo, la alimentación (Albrecht-Ruiz & Salas-Maldonado, 2015, Kudale and Rathod, 2015, Herawati et al., 2018), estadio sexual, tiempo de captura y zona de pesca influyen en la composición proximal de anchoveta utilizada.

Los desafíos al trabajar con especies con alto contenido de humedad, como la anchoveta, hacen que la materia prima pueda ser una fuente idónea para la colonización de microorganismos. En ese contexto, dado que los valores de humedad en esta especie y otras similares se encuentran entre 75 y 81 % (Kari et al, 2022) es necesario tomar precauciones al momento del transporte, almacenaje y procesamiento de la materia prima para mantener la inocuidad.

Similar fenómeno de la influencia de los factores externos en la composición proximal se cumple con los niveles de grasa. Estos se registran en la anchoveta peruana entre  $1.52 \pm 0.09$  y  $7.73 \pm 0.08$  % (Albrecht-Ruiz & Salas-Maldonado, 2015, Pariona-Velarde et al. 2020). Sin embargo, los valores reportados en el presente estudio estuvieron en el rango de esas variaciones de acuerdo al estadio sexual. Es importante, destacar que la anchoveta es una buena fuente de grasas saludables entre las cuales se encuentran las polinsaturadas DHA y EPA, con impacto directo en la salud humana (Zárate et al., 2017) las cuales adicionan, junto con las proteínas, un valor nutricional adicional a las componentes del presente trabajo.

#### **4.1.2. Determinación de la actividad enzimática**

Las enzimas comerciales utilizadas fueron Corolase® 7089 and Corolase® 8000, estas son enzimas comerciales derivadas de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma reesei* respectivamente, las mismas que fueron utilizadas en investigaciones respecto a reacciones enzimáticas para la obtención de proteínas hidrolizadas de organismos hidrobiológicos (Senadheera et al., 2021; Kakko et al., 2022; Valerio et al., 2023). Estas últimas se prefieren por encima de las

de las de plantas y animales debido a su amplia especificidad y manipulación genética (Singh et al., 2016). Para el presente estudio se determinó la Actividad Enzimática a la temperatura fijada para el proceso, esto previo al inicio de los experimentos, reportando los valores mostrados en la tabla 21.

Tabla 21. Actividad enzimática (U\*/ml) de las proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089 a pH=6.2 y a la temperatura de 60°C

Temperatura (°C)	Actividad Enzimática (U/ml)	
	Enzima 1 - Corolase 7089	Enzima 2 - Corolase 8000
60 °C	1050.08 ± 110.2	850.7 ± 115.1

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

En el presente estudio se trabajó a 60 °C y pH de 6.2±0.2 (pH natural de la materia prima), parámetros del estudio (*Know How COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.*). Si bien 60° C se encuentra en el óptimo de trabajo sugerido para Corolase 7089®, y debajo de lo estipulado para Corolase 8000®, los resultados de la actividad enzimática utilizando caseína como sustrato en el nivel de pH de 6.2±0.2 demuestran su actuación sobre las proteínas. Respecto a Corolase® 8000 los resultados demuestran a 60°C la actividad enzimática es menor respecto a Corolase® 7089

La temperatura establecida para el proceso (60°C) se estableció con el fin de estandarizar los parámetros de producción de maquinaria y equipos implementada por Colpex International S.A.C. Esta temperatura se encuentra en el umbral de eficiencia y el rango de pH de las Corolase ® 7089 y Corolase® 8000, hasta 60 y hasta 80 °C, entre 5.5 - 8.5 y 6.0 - 11.0, respectivamente (AB enzymes, 2023). Las actividades proteolíticas especificadas se miden en las condiciones óptimas de pH y temperatura para las enzimas respectivas, condiciones no necesariamente pertinentes o conformes con la aplicación estudiada. Por lo que, la elección del pH y temperatura para la reacción enzimática es altamente dependiente de lo

que el operador desea lograr. Las condiciones de temperatura y pH podrían influir en otros parámetros, como, por ejemplo, el grado de amargor del producto.

Principalmente, la temperatura de reacción enzimática cercana al valor óptimo de Corolase 7089® para la maximización del grado de hidrólisis, involucraría el incremento del nivel de amargor en la hidrólisis de enzimática de la anchoveta *E. ringens* y representa una limitante si se emplea un hidrolizado excesivamente amargo para el consumo humano (Valerio et al., 2023).

Al respecto, se ha señalado en estudios previos que la aplicación de una sola enzima no sería eficaz para hidrolizar proteínas alimentarias (Rao et al., 2020; Xu et al., 2019). Por lo tanto, en el presente estudio se mezclaron ambas enzimas considerando las pruebas preliminares desarrollados por el equipo técnico de Colpex International S.A.C. para evaluar su actividad enzimática a 60°C y pH 6.2±0.2 sobre *E. ringens* para producir hidrolizados, los valores obtenidos se contrastaron con resultados obtenidos de otras investigaciones como la de Aspevik *et al.* (2016) que reporto la actividad enzimática de la Corolase 7089 a 50°C con pH 6.5 (1.0 U/mg de enzima), esta última es menor al resultado de este estudio por ser una menor temperatura, en relación a la Corolase 8000 no se encontró literatura con resultados actividad enzimática, por ser una enzima comercial relativamente nueva.

Es preciso mencionar que la actividad enzimática se expresa de acuerdo al método analítico utilizado, por ello se pueden encontrar valores de actividad expresados en unidades Anson (AU), de hemoglobina (UHb), azocol (azoU) o de caseína (U), entre otros (Aspevik *et al.*, 2016); esto dificulta realizar una comparación adecuada de los resultados reportados por otros autores.



### 4.1.3. Hidrólisis enzimática de Anchoqueta

Los resultados de los valores observados para el grado de hidrólisis (cuantificado mediante °Brix referenciales-Bx ref.) con diferentes combinaciones de las variables independientes se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Resultados experimentales del modelo factorial Box-Benhken para la hidrólisis enzimática de Anchoqueta.

Experi- mentos	Variables experimentales					Variables respuesta					
	Enzima 1 (Corolase 7089)	Enzima 2 (Corolase 8000)	ΣEnzima X1	Sustrato X2	Tiempo de reacción X3	°Bx ref.		% SI		% G	
						Observados	Previstos	Observados	Previstos	Observados	Previstos
<b>1</b>	0.04	0.16	0.2	0.45	45	7	7.13	31.62	31.55	2.4	2.23
<b>2</b>	0.06	0.24	0.3	0.5	45	7.5	8.29	34.16	35.61	2.8	2.80
<b>3</b>	0.04	0.16	0.2	0.55	45	8	8.00	33.62	33.55	2.6	2.65
<b>4</b>	0.06	0.24	0.3	0.45	60	9	9.00	33.96	33.51	2.6	2.64
<b>5</b>	0.06	0.24	0.3	0.55	60	10.5	11.13	44.11	43.53	2.7	2.51
<b>6</b>	0.08	0.32	0.4	0.5	30	8	8.13	39.47	38.89	2.8	2.66
<b>7</b>	0.06	0.24	0.3	0.55	30	10	9.38	40.35	4.93	2.4	2.36
<b>8</b>	0.08	0.32	0.4	0.55	45	12.5	12.50	38.09	38.16	2.8	2.98
<b>9</b>	0.06	0.24	0.3	0.45	30	7.5	7.25	30.47	30.92	1.4	1.59
<b>10</b>	0.08	0.32	0.4	0.45	45	9	9.12	31	31.07	2.8	2.75
<b>11</b>	0.04	0.16	0.2	0.5	60	9	8.41	38.83	39.42	2.7	2.84
<b>12</b>	0.08	0.32	0.4	0.5	60	10.5	9.91	34.81	35.26	2.7	2.71
<b>13</b>	0.06	0.24	0.3	0.5	45	8.5	8.29	37.5	35.61	2.8	2.80
<b>14</b>	0.06	0.24	0.3	0.5	45	8	8.29	35.16	35.61	2.8	2.80
<b>15</b>	0.04	0.16	0.2	0.5	30	6.5	6.66	31.04	30.60	1.7	1.69

Los °Bx ref. expresan la cantidad de sólidos soluble presentes en el hidrolizado de la proteína, por ello a medida que la cantidad de solido soluble aumenta, refleja un mayor grado de hidrolisis. Como se observa, los °Brix referenciales variaron entre 6.5 y 12.5 (equivalentes entre 9 y 20% de grado de hidrolisis). Los porcentajes de hidrolisis de proteínas utilizando como materia prima organismos hidrobiológicos fueron menores a los hallados por You et al. (2010); Nagash & Nazeer (2011), pero mayores de aquellos reportados por Rodriguez-

Diaz et al., 2011; Azizi et al, 2019. Estas diferencias se podrían deber al uso de diversas enzimas, parámetros fisicoquímicos y composición proximal de la materia prima.

Por otro lado, se observó que los sólidos insolubles (%SI) variaron de 30.47 a 44.11 %. Asimismo, el porcentaje de grasa (%G) varió entre 1.4 y 2.8 %. Si bien las enzimas utilizadas tienen un efecto directo en las proteínas de la materia prima, es de esperar que otros elementos, como los sólidos insolubles y el porcentaje de grasa, varíen. En efecto, los sólidos insolubles (mayor porcentaje) son producidos por algún defecto en la optimización de los parámetros fisicoquímicos del hidrolizado (para el caso de las proteínas no hidrolizadas), o se tratan de componentes que las enzimas utilizadas no tienen afinidad (huesos, partes insolubles como la grasa, los residuos de hueso, tejido conectivo) que suelen separarse en el proceso (Baez-Suarez et al., 2016). En ese contexto, el porcentaje de sólidos insolubles es una medida de la eficiencia de la actuación de la interrelación de los parámetros evaluados sobre el sustrato.

En esa misma línea, obtener menores porcentajes de grasa en el hidrolizado con el objetivo de aumentar el tiempo de vida del producto final (Kristinsson & Rasco, 2000). Las grasas pueden cambiar su configuración con el tiempo, aportando sabores desagradables (rancidez) al producto final (Gildberg, 1993; Šližytė et al., 2005; Amiza et al., 2011). De los resultados respecto al porcentaje de grasa se infiere que esta es directamente proporcional al grado de hidrólisis (cuantificado como Brix referencial), a medida que aumenta la ruptura de enlaces peptídicos el porcentaje de grasa aumenta producto de la liberación de ácidos grasos.

#### **4.1.4. Optimización de las variables independientes sobre los grados Brix referenciales (°Bx Ref), porcentaje de sólidos insolubles (% SI) y porcentaje de grasa (% G).**

Se utilizó el Modelos de Superficie Respuestas (MSR) con un diseño de Box Benhken para evaluar el efecto interactivo de las variables experimentales (enzima, sustrato y tiempo de reacción) en la hidrólisis de proteínas de la anchoveta (*E. ringens*). La metodología de

superficie de respuesta explora la relación entre varias variables independientes y las variables respuesta. Una de las características de la aplicación de esta metodología es la búsqueda de las condiciones óptimas para la respuesta deseadas (maximizadas o minimizadas) y reducción del número de experimentos.

Luego que los resultados del diseño de Box Benhken fueron analizados utilizando modelos polinómicos lineales, 2FI, cúbicos y cuadráticos, se obtuvieron los resultados los cuales se muestran en el Tabla 23.

En el caso de °Bx Ref. se observa que las variables independientes enzima, sustrato y tiempo de reacción, y el cuadrado del sustrato son significativas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, sustrato y tiempo de reacción fueron más significativos ( $p < 0.01$ ).

Para el Porcentaje de sólidos insolubles (%SI), las variables sustrato y tiempo de reacción, la interacción enzima – tiempo de reacción y la variable al cuadrado del tiempo de reacción fueron significativa ( $p < 0.05$ ). El sustrato es más significativo ( $p < 0.01$ ). La enzima no es significativa.

Con respecto al Porcentaje de grasa (%G), las variables independientes enzima y tiempo de reacción, la interacción enzima-tiempo de reacción, el cuadrado del tiempo de reacción y la enzima multiplicada por el sustrato, fueron significativos ( $p < 0.05$ ). Es de destacar también que los valores previstos por los modelos obtenidos se correlacionaron con los valores observados.

Basados en los resultados obtenidos en la Tabla 23, las ecuaciones de regresión del análisis de superficie de respuesta para °Bx Ref, % de SI y % grasa fueron:

$$\bullet \text{Brix Ref.} = -160.786 + 820 * \text{Enzima} + 673.04 * \text{Sustrato} + 0.058 * \text{Tiempo de Reacción} - 689.29 * \text{Sustrato}^2 \text{ [Eq. 4]}$$

Tabla 23. Análisis de varianza para Bx ref., %SI y %G.

ANOVA	°Bx ref.					%SI					%G				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
<b>Model</b>	32.57	6	5.43	18.35	0.0003	215.76	9	23.97	0.0042		2.36	9	0.2618	7.37	0.0202
<b>A-Enzima</b>	2.25	1	2.25	7.61	0.0247	8.53	1	8.53	5.29	0.0697	0.3612	1	0.3612	10.18	0.0243
<b>B-Sustrato</b>	9.03	1	9.03	30.54	0.0006	100.3	1	100.3	62.25	0.0005	0.2112	1	0.2112	5.95	0.0587
<b>C-Tiempo de Reacción</b>	6.13	1	6.13	20.71	0.0019	13.47	1	13.47	8.36	0.0341	0.72	1	0.72	20.28	0.0064
<b>AB</b>	1.56	1	1.56	5.28	0.0506	6.48	1	6.48	4.02	0.1013	0.01	1	0.001	0.2817	0.6183
<b>AC</b>	-	-	-	-	-	38.75	1	38.75	24.05	0.0045	0.3025	1	0.3025	8.52	0.033
<b>BC</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2025	1	0.2025	5.7	0.0625
<b>A^2</b>	-	-	-	-	-	9.51	1	9.51	5.9	0.0595	0.0023	1	0.0023	0.065	0.8089
<b>B^2</b>	3.04	1	3.04	10.27	0.0125	0.65	1	0.65	0.4034	0.5532	0.1131	1	0.1131	3.19	0.1344
<b>C^2</b>	-	-	-	-	-	15.3	1	15.3	9.49	0.0274	0.4253	1	0.4253	12.74	0.0161
<b>AB^2</b>	1.53	1	1.53	5.18	0.0524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A^2B</b>	-	-	-	-	-	14.96	1	14.96	9.28	0.0285	-	-	-	-	-

$$\%SI = +196.77 - 300.67 * \text{Sustrato} - 0.1051 * \text{Tiempo de Reacción} - 2.08 * \text{Enzima} * \text{Tiempo de Reacción} + 0.009 * \text{Tiempo de Reacción}^2 - 5470 * \text{Enzima}^2 * \text{Sustrato} \text{ [Eq. 5]}$$

$$\%Grasa = -31.51 + 13.88 * \text{Enzima} + 0.37 * \text{Tiempo de Reacción} - 0.18 * \text{Enzima} * \text{Tiempo de Reacción} - 0.00156 * \text{Tiempo de Reacción}^2 \text{ [Eq. 6]}$$

En consecuencia, el ANOVA, confirmó la significancia ( $p < 0.05$ ) de los modelos propuestos. Al observar los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), los valores obtenidos superan el 0.93. Valores cercanos a uno (1) son considerados bien correlacionados y los modelos de ajustan mejor a los resultados observados (Saleem et al., 2020). Por lo tanto, indica también que los modelos propuestos explican el 93 %, 96 % y 93 % ( $R^2$ ) del efecto de las variables independientes (Enzima, Sustrato, Tiempo de Reacción) y sus interacciones sobre las respuestas (Mohanty et al., 2021)

#### **4.1.5. Valores óptimos para la obtención de 8°Brix referencial (Bx ref.), minimizando el porcentaje de sólidos insolubles(%SI) y grasa(%G) en la reacción enzimática**

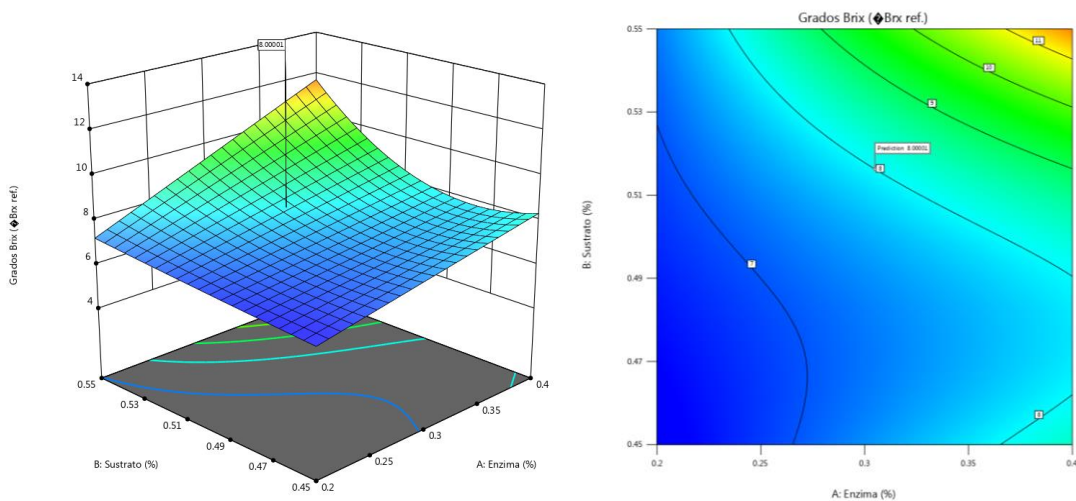
El valor de 8 °Bx ref. fue fijado para garantizar que el tamaño de los péptidos obtenidos de la fase soluble sean menores a 1000 Da y mayores a 400 Da. Dado que este parámetro del estudio fue determinado de acuerdo al proceso de filtrado implementado por Colpex International S.A.C., el equipamiento para la realización de la hidrólisis enzimática limita el tamaño de péptidos a obtener debido al filtro de osmosis inversa implementado (*Know How Colpex Intenational S.A.C.*).

En este contexto, los valores óptimos de las variables del proceso para la obtención de 8° Bx ref. fueron: Enzima 0.305 g/100g de sustrato, sustrato 0.516 % y tiempo de reacción de 31.64 min (Figura 11). El índice de deseabilidad para el modelo fue igual a 1.0, lo que indica que

los parámetros fueron óptimos para obtener 8 °Bx ref. en el proceso de hidrolisis de proteína de anchoveta *E. ringens*. Sin embargo, al mantener 8°Bx ref. y optimizar al mínimo los valores de % SI y % G, los parámetros se estimaron en: Enzima 0.364g /100g sustrato, sustrato 0.45% y tiempo de reacción de 31.87min (Figura 12). Al realizar este proceso, el índice de deseabilidad se redujo a 0.799.

Los gráficos de superficie de respuesta mostraron el resultado de los valores de la optimización de las variables y las variables respuesta teniendo en cuenta 8 °Bx ref.

Del gráfico de superficie y de contorno se puede deducir que es posible obtener mayores °Bx ref cuando la enzima y el sustrato están en su máximo nivel sin considerar el % de SI y % de G. Cuando el sustrato es mayor y hay poca enzima, los °Bx ref no aumentan sustancialmente (Fig 11A). En este sentido, el sustrato y la enzima se correlacionan linealmente.



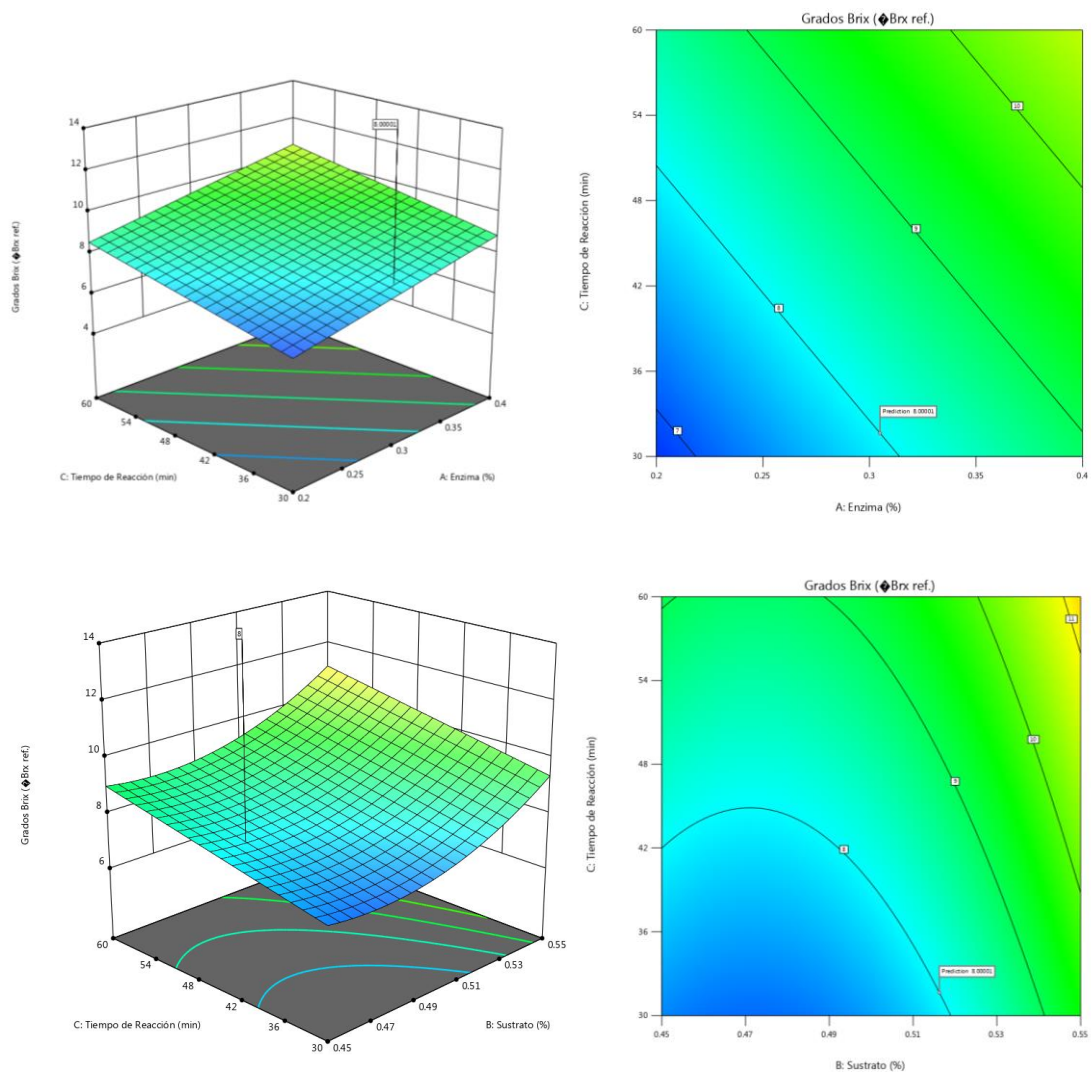


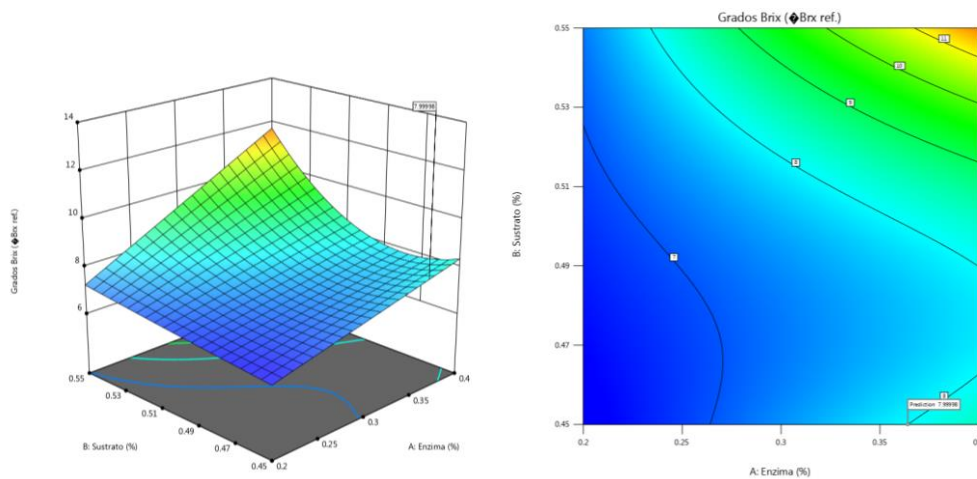
Figura 11. Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para 8 °Bx ref. A) Interacción sustrato enzima. B) Interacción Tiempo de reacción enzima. C) Interacción Tiempo de reacción sustrato.

El tiempo de reacción también y la concentración de enzima también se correlacionan linealmente. Sin embargo, aumentar al máximo estas dos variables no contribuye a la maximización de los °Bx ref. (Fig 11B) en comparación con la interacción enzima sustrato.

Al evaluar el tiempo de reacción con el porcentaje de sustrato (Figura 11C) se evidencia que hasta cerca de 0.52 % de sustrato aproximadamente manteniendo el tiempo alrededor de 42 min, los °Bx ref. están alrededor de 8. También, utilizando el mínimo de sustrato y maximizando el tiempo de reacción, los °Bx ref. no sobrepasan 9.

Al fijar la variable Bx ref. en 8, minimizando el porcentaje de sólidos insolubles (% SI) y grasa (% G), los gráficos de superficie y contorno muestran similar patrón para la interacción sustrato enzima y tiempo de reacción enzima respecto al obtenido en el análisis previo (Figura 12A y B).

En caso de la interacción tiempo de reacción sustrato, es importante destacar que para obtener 8 °Bx ref, minimizando el porcentaje de sólidos insolubles y grasa, es necesario utilizar el mínimo porcentaje de sustrato y reducir cerca del límite inferior el tiempo de reacción (Fig. 12C). Teniendo en consideración estos últimos parámetros, es necesario considerar que, en este caso, la concentración de enzima está cerca del máximo (0.364g/100g sustrato) para que mayor número de moléculas enzimáticas estén disponibles para descomponer la proteína en unidades de péptidos más pequeños (Jang et al., 2005). Con menores concentraciones de sustrato en tiempo de reacción cortos, es necesario, por lo tanto, asegurar la actuación de las enzimas.





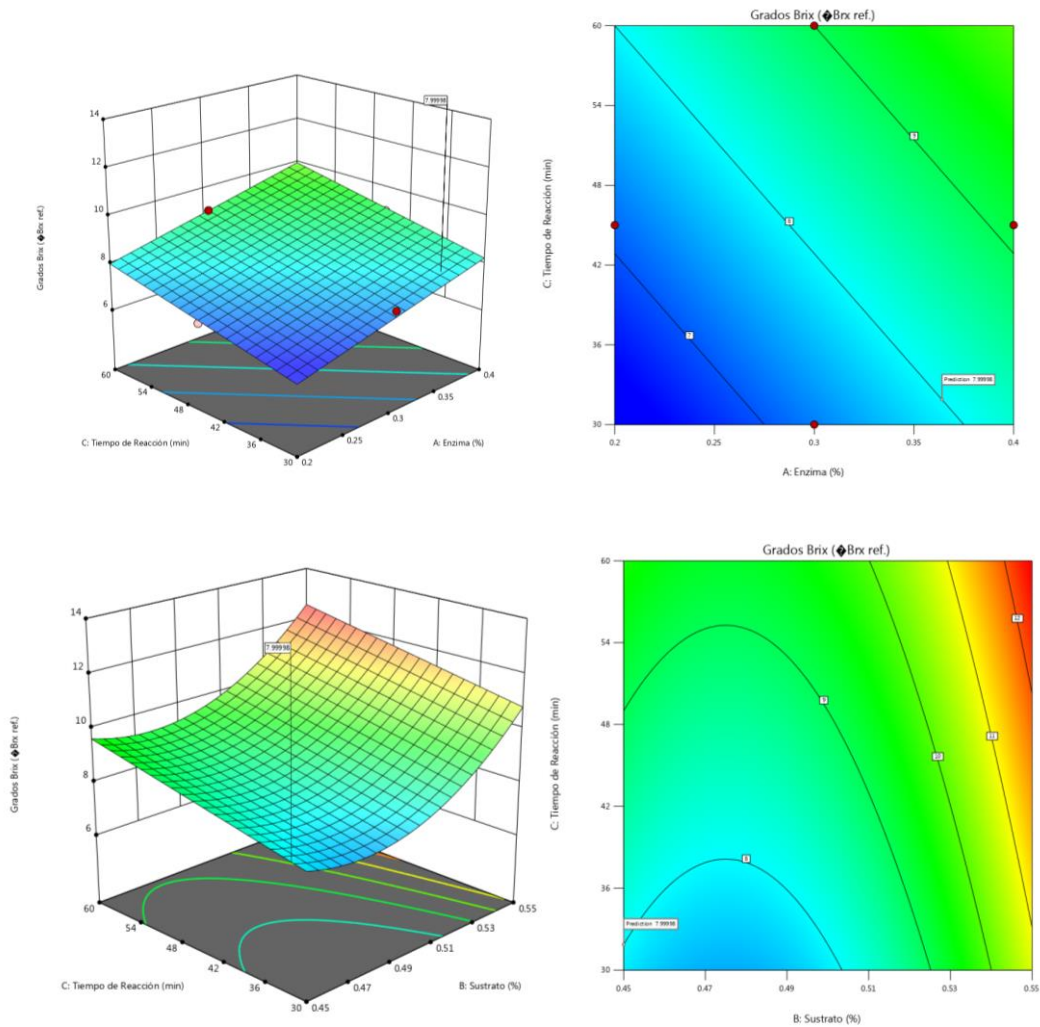


Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para 8 °Bx ref., minimizando el porcentaje de sólidos insolubles y grasa A). Interacción sustrato enzima. B) Interacción Tiempo de reacción enzima. C) Interacción Tiempo de reacción sustrato.

#### 4.1.6. Validación de condiciones óptimas

En la Tabla 24 se muestran las condiciones de hidrólisis de la anchoveta entera empleadas para la validación experimental de los valores óptimos para la obtención de 8 ° Brix ref. minimizando el porcentaje de sólidos insolubles y grasa.

Tabla 24. Condiciones óptimas de hidrólisis enzimática de Anchoveta entera para la validación experimental a nivel industrial.

<b>Factor</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Valor</b>
Concentración de sustrato	%	0.45
Concentración de enzima	%	0.36 (0.085 de Corolase 7089 y 0.275 de Corolase 8000)
Tiempo de reacción	Min	31.87
pH (sin ajuste)	-	~6.2
Agitación	rpm	200
Temperatura	°C	60

Los resultados de la validación del modelo de optimización se presentan en la Tabla 25. Los valores de °Bx ref, %SI y %G obtenidos en la validación fueron similares a los obtenidos en la predicción realizada por el modelo en un intervalo de confianza del 95%. Los resultados demuestran que el modelo matemático fue capaz de predecir el comportamiento y optimizar el rendimiento en función a las variables respuesta en la hidrólisis enzimática de Anchoveta peruana entera para obtención de péptidos solubles.

Tabla 25. Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la hidrólisis de Anchoveta para la producción de péptidos solubles.

<b>Variable respuesta</b>	<b>Predicción (IC 95%)</b>	<b>Validación (IC 95%)</b>
°Bx ref.	7.99	7.91
%SI	32.65	33.08
%G	2.6	2.32

En la Tabla 26 se muestra las características fisicoquímicas del hidrolizado líquido que se obtuvo mediante la hidrólisis de proteínas de anchoveta peruana en condiciones para la obtención de 8°Bx ref. minimizando la generación de sólidos insolubles y grasa.

Tabla 26. Composición fisicoquímica del Hidrolizado líquido de Anchoveta entera aplicando los parámetros optimizados para la obtención de 8°Bx ref., minimizando sólidos insolubles y grasa.

<b>Composición (base húmeda)</b>	<b>Promedio (%)</b>
Proteína	8.73 + 0.15

Humedad	87.32 ± 0.23
Ceniza	1.03 ± 0.05
Grasa	2.32 ± 0.07
pH	6.14 ± 0.10
Sólidos solubles (°Bx ref)	7.91 ± 0.30
Grado de Hidrolisis	14.03± 0.18

Como se observa en la tabla 26, el grado de hidrólisis cuantificado respecto a un valor de 7.91 °Brix referenciales obtenidos fue de 14.03 % para el hidrolizado entero de anchoveta. Otros estudios con la misma especie han reportado valores mayores o más elevados que el presente estudio. Por ejemplo, Pandia et al. (2013) utilizando anchoveta entera reportaron hasta 19 % de grado de hidrólisis con Protamex® y 90 min de reacción. Roldán et al. (2021) reportaron un grado 39 % de grado de hidrólisis utilizando anchoveta entera y las enzimas Protamex® y Flavorurzyme® en un tiempo de reacción de 2 horas. Por otro lado, Sifuentes-Penagos et al. (2018) hallaron que utilizando 0,7 kg pescado × kg-1 agua y un tiempo de reacción de 60 min, correspondieron a obtener valores de 16,90% para el grado de hidrólisis. Últimamente, Valerio et al. (2023) registró 14.8 % de grado de hidrólisis utilizando anchoveta en conjunto con las enzimas Corolase 8000 (60.1°C, 93.4 min y 1.68 % de enzima) y Corolase 7089 (49.1°C, 54.3 min y 0.472 % de enzima) en tiempos secuenciales. A diferencia de Valerio et al. (2023), se redujo el porcentaje de inclusión de las enzimas y menor tiempo de reacción para obtener grados de hidrólisis superiores. En consecuencia, las comparaciones en general parecen ser subjetivas dado que el grado de hidrólisis y otras variables respuestas van a depender de varios factores como el tiempo de reacción, la enzima utilizada, el porcentaje y tipo de sustrato utilizado y tamaño de final de las proteínas que se desea conseguir. Sumado la mayoría de investigaciones publicadas reportan pruebas desarrolladas a nivel de laboratorio, en muchas de las cuales el objetivo es obtener el mayor grado de hidrolisis sin considerar las implicancias en gasto energético y productivo que demandaría su escala a nivel industrial. Razón por la cual el presente estudio al ser realizado

a nivel industrial, se realizó optimizó el proceso para obtener un hidrolizado que reúna las características deseadas en un mínimo costo productivo y operacional.

## **4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA FASE 2 DE LA INVESTIGACIÓN**

La fase 2 de la presente investigación reportó los siguientes resultados:

### **4.2.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la materia prima e insumos para la elaboración del grano símil de arroz.**

#### **a) Harina de arrocillo**

La composición proximal de la harina de arroz (arrocillo) variedad NIR-I utilizada en el presente estudio reportó un contenido promedio de 10.9% de humedad, 7.45% de proteína cruda, 0.83% de grasa y 0.61% de cenizas. El código del producto utilizado se encuentra registrado como cultivar IR-43 (SENASA, 2020). Los valores proximales hallados son similares a los reportados por Ping W et al., 2022 quienes reportaron para harina de arroz valores promedio de humedad (%), proteína(%) y grasa (%) de 10.82 -11.73, 7.31-8.04 y 0.82-1.50 respectivamente. Asimismo, para el arroz, Wenhan et al., 2019, reportaron una 12.8%, humedad, 7.3% de proteína y 0.9% de grasa. El valor de humedad se encuentra por debajo del máximo permitido (máximo 14%) para arroz según NTP 205.011:2021.

#### **b) Concentrado proteico hidrolizado**

El concentrado proteico hidrolizado obtenido con los parámetros optimizados en la fase 1, fue sometido a un proceso de atomización bajo los parámetros de proceso estandarizados de Colpex Interntional S.A.C para su conversión en polvo, este concentrado reportó la siguiente composición proximal (ver tabla 27; 28; 29 y 30):

Tabla 27. Composición físico química del concentrado proteico hidrolizado en polvo

Descriptor	Valores reportados
Humedad	4.16 %
Proteína	81.41 %
Grasa	0.52 %
Cenizas	10.41 %
Cloruros	4.18 %
TBVN	98 mg/ 100g
Histamina	28.4 mg/100g
Digestibilidad a la pepsina	98.04 %
Densidad aparente	0.20g/mL
Densidad compactada	0.24 g/mL
Tamaño de partícula	
Entre 1.68 y 0.074 mm	88.82%
Mayor a 1.68 mm	0.00%
Menor a 0.074 mm	11.18%
Acidez	0.07%

De acuerdo a los valores reportados, se observó que concentrado proteico hidrolizado es un ingrediente altamente higroscópico por bajo contenido de humedad (4.16%), lo que implicó agilizar el proceso de mezclado. Asimismo, los valores de TBVN y histamina permiten identificar la calidad de la materia prima por sus valores inferiores a lo permitidos (Menor a 200ppm) según SANIPES (2016). El valor de proteína (81.41%) es superior a cualquier harina convencional incluyendo la harina de pescado clasificada como super prime (68-70%) (Pesquera Exalmar S.A.A. (2023)). Si bien es cierto la concentración de cenizas es elevada, esta es propia del contenido de minerales propios de la anchoveta, precisando que el sistema de filtrado previo durante el proceso productivo garantiza la reducción de contenido de metales como se observa en la tabla 28.

Tabla 28. Análisis de metales pesados y micronutrientes presentes en el concentrado proteico hidrolizado en polvo

Descriptor	Valores reportados
Metales pesados	
Arsénico*	2.85 mg/kg
Cadmio*	0.025 mg/kg
Mercurio*	<0.01 mg/kg
Plomo*	<0.02 mg/kg
Micronutrientes	
Sodio**	9.136 g/kg

Potasio**	11.39 g/kg
Hierro**	59.61mg/kg
Fosforo**	5.126 g/kg
Magnesio**	948.8 mg/kg
Cromo**	2.39 mg/kg
Molibdeno**	0.17 mg/kg
Flúor ***	4.22 mg/kg

(\*) Fuente: COLPEX INTERNATIONAL SAC

(\*\*) Fuente: Informe de ensayo N° AG237850- Lab. Bureau Veritas

(\*\*\*) Fuente: Informe de ensayo N° AG238795- Lab. Bureau Veritas

Los valores de metales pesado reportados son menores a los Límites Máximos Permisibles establecidos por la autoridad sanitaria competente SANIPES (2016) para concentrados de proteína de pescado (Flúor 250 mg/kg, Mercurio 0,5 mg/kg , Plomo 2,5 mg/kg, Cadmio 2 mg/kg, Arsénico 25 mg/kg), esto garantiza que el producto es apto para su inclusión como ingrediente en elaboración de alimentos sin causar ningún riesgo sobre la presencia de metales pesados.

Tabla 29. Perfil de Aminoácidos presentes en el del concentrado proteico hidrolizado en polvo

<b>Aminoácidos</b>	<b>Contenido</b>
<b>Fenilalanina</b> + Tirosina	3.66 g/100 g
<b>Isoleucina</b>	2.25 g/100 g
<b>Leucina</b>	4.78 g/100 g
<b>Lisina</b>	5.92 g/100g
<b>Metionina</b> + Cistina	2.11 g/100g
<b>Treonina</b>	2.59 g/100g
<b>Triptófano</b>	0.50 g/100g
<b>Valina</b>	2.95 g/100g
Alanina	4.72 g/100g
Argidina	3.76 g/100g
Glicina	4.29 g/100g
<b>Histidina</b>	3.50 g/100g
Ácido aspártico	5.81 g/100g
Ácido glutámico	9.26 g/100g
Prolina	2.59 g/100g
Serina	2.45 g/100g

Fuente: Colpex International S.A.C.

El concentrado proteico hidrolizado (en polvo) de anchoveta entera, contiene todos los Amino Acidos esenciales, destacando un alto contenido de Lisina, este Aminoácido limitante en el caso de cereales como el Arroz. Los valores obtenidos

son superiores a una harina de pescado convencional de mayor calidad (super prime) que reporta un contenido de 5g/100g y Metionina 1.3g/100g. (TASA, 2023)

Tabla 30. Análisis microbiológico del concentrado proteico hidrolizado

Agente microbiano	Ufc/g
Enterobacterias	<10
Levaduras	<10
Mohos	<10
Salmonella	No detectado

Fuente: Informe de ensayo N° AG-238333-Lab. Bureau Veritas.

Los valores reportados son inferiores a los Límites máximos establecidos por norma para los productos hidrobiológicos deshidratados (concentrados proteicos y otros de consumo humano) establecidos en la Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, vigentes en el Perú (MINSA, 2008).

Por lo antes señalado, el Concentrado Proteico hidrolizado de anchoveta entera en polvo, clasificado como Tipo A por Colpex International S.A.C. por tener un % de proteína mayor a 80. Hidrolizado fue envasado en Bolsas trilaminadas en presentaciones de 7.5 o 15 kg (peso neto), el mismo que según estudio de vida útil realizado por Colpex international S.A.C. se determinó una vida útil de 24 meses, almacenado a temperatura ambiente y protegido de la luz solar, Ver figura 13.



Figura 13. Concentrado Proteico Hidrolizado de Anchoveta entera en polvo obtenido con los parámetros de proceso optimizados en la fase 1.

**4.2.2. Efecto de las variables independientes (Concentrado proteico y Aditivo) sobre las variables respuesta; Contenido proteico (%P), Porcentaje de pérdida por cocción (%PC) y Grado de similitud respecto al grano de arroz (°S).**

Con base a lo señalado anteriormente, se evaluó el efecto interactivo de las variables experimentales (porcentaje de Concentrado proteico en polvo y porcentaje de Aditivo) en las variables respuesta (Contenido proteico (%P), Pérdida por cocción (%PC) y grado de similitud (°S)).

Los valores obtenidos utilizando el diseño factorial se muestran en la tabla 31. Como se observa, se registraron valores entre 10.55 y 20.48 para el % P utilizando 5 % y 0.2 %, y 17.5 % y 0.1% de Concentrado proteico hidrolizado en polvo y aditivo. Respecto al %PC, se obtuvo entre 1.08 y 35.64 con 5% y 0.2 %, y 30% y 0.2% de Concentrado proteico hidrolizado y aditivo. El mayor grado de similitud se obtuvo con la combinación de 5 % y 1%, mientras que el menor valor se registró con 30% y 0.1% de Concentrado proteico y Aditivo, respectivamente.

Tabla 31. Resultados experimentales del modelo factorial 2<sup>k</sup> la sustitución parcial de la harina de arrozillo.

Experimentos	Variables experimentales		Variables Respuesta					
	Concentrado proteico hidrolizado (%)	Aditivo (%)	Proteína (%P)		Pérdida por cocción (%PC)		Similitud al grano de arroz (°S)	
			Observado	Previsto	Observado	Previsto	Observado	Previsto
1	30	0.2	28.25	28.20	38.16	35.64	2.3	2.50
2	17.5	0.1	20.48	20.50	11.05	8.30	4.5	5.87
3	17.5	0.15	20.02	20.08	8.95	8.70	6.3	6.27
4	17.5	0.15	20.12	20.08	8.89	8.70	6.5	6.27
5	5	0.15	10.62	10.58	3.32	2.59	8.2	8.33



<b>6</b>	5	0.2	10.55	10.57	2.35	1.08	7.9	8.73
<b>7</b>	17.5	0.15	20.13	20.08	9	8.70	6.4	6.27
<b>8</b>	30	0.15	28.42	28.51	28.13	29.90	2.2	2.10
<b>9</b>	30	0.1	29.13	29.09	25.13	25.88	1.8	1.70
<b>10</b>	5	0.1	10.83	10.85	3.82	5.82	8.9	7.93
<b>11</b>	17.5	0.2	19.89	19.92	7.02	10.81	7.4	6.67
<b>12</b>	17.5	0.15	20.08	20.08	9.02	8.70	6.5	6.27

Luego que los resultados del diseño factorial fueron analizados se obtuvo los resultados los cuales se muestran en el Tabla 31.

En el caso del contenido proteico (%P), el análisis de varianza (ANOVA) demuestra que los elementos lineales y de interacción tienen influencia en la variable respuesta ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, el porcentaje por pérdida de cocción (%PC) se ve influenciado principalmente ( $p < 0.01$ ) por el % Concentrado proteico, en menor medida por los otros elementos ( $p < 0.05$ ), excepto por el aditivo ( $p > 0.05$ ). El concentrado proteico es el elemento más influyente para el grado de similitud (°S), como se observa en la tabla 32 del ANOVA. El aditivo, no tiene influencia en esta variable respuesta.

Basados en los resultados obtenidos en la Tabla 32, las ecuaciones de regresión del análisis de superficie de respuesta para %P, %PC y °S fueron:

$$\%P = 7.92 + 0.87 * \text{Concentrado Proteico Hidrolizado} - 17.68 * \text{Aditivo} - 0.24 * \text{Concentrado Proteico Hidrolizado}^2 + 53.50 * \text{Aditivo}^2 \quad [\text{Eq. 7}]$$

$$\%PC = 23.53 - 1.47 * \text{Concentrado Proteico Hidrolizado} + 5.80 * \text{Concentrado Proteico Hidrolizado} * \text{Aditivo} + 0.04 * \text{Concentrado Proteico Hidrolizado}^2 \quad [\text{Eq. 8}]$$

$$°S = 7.37 - 0.014 * \text{Concentrado proteico Hidrolizado} + 8.00 * \text{Aditivo} - 0.0067 * \text{Concentrado proteico Hidrolizado}^2 \quad [\text{Eq. 9}]$$

Tabla 32. Análisis de varianza del contenido proteico (%P), Perdida de cocción (%PC) y Grado de similitud al grano de arroz (°S)

ANOVA	%P					%PC					°S				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
<b>Model</b>	483.77	5	96.75	23844.7	<0.00001	1366.64	5	273.33	42.69	0.0001	62.55	3	20.85	39.34	<0.00001
<b>A-%CP</b>	482.41	1	482.41	1.19E+05	<0.00001	1118.75	1	1118.75	174.72	<0.00001	58.28	1	58.28	109.97	<0.00001
<b>B-Aditivo</b>	0.5104	1	0.5104	125.79	<0.00001	9.45	1	9.45	1.48	0.2701	0.96	1	0.96	1.81	0.2152
<b>AB</b>	0.09	1	22.18	0.0033	0.0033	52.56	1	52.56	8.21	0.0286	3.31	1	3.31	6.24	0.0371
<b>A^2</b>	0.7526	1	0.7526	185.48	<0.00001	151.81	1	151.81	23.71	0.0028	-	-	-	-	-
<b>B^2</b>	0.0477	1	0.0477	11.76	0.014	1.95	1	1.95	0.3044	0.601	-	-	-	-	-

Para todos los casos, el ANOVA confirmó la significancia de los modelos. Estos a su vez mostraron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 93 %, lo cual sugiere que los modelos son adecuados (Salem et al., 2020).

#### **4.2.3. Maximización de contenido proteico (%P), minimización de pérdidas por cocción (%PC) y mayor similitud del grano símil de arroz (°S).**

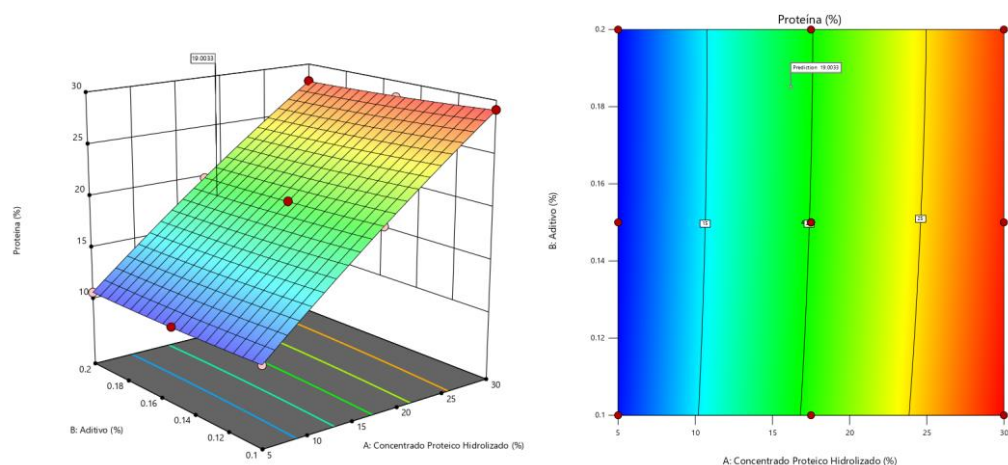
Para maximizar el % P, minimizar el %PC y maximizar el °S, se requiere utilizar 16.19 % de Concentrado proteico hidrolizado y 0.19 % de aditivo. Esta combinación de elementos registra un nivel de deseabilidad de 0.65.

Los gráficos de superficie de respuesta muestran los valores de la optimización de las variables para lograr dichos márgenes. Del gráfico de superficie y de contorno se puede mencionar que para la obtención de un mayor %P es necesario utilizar mayor concentración de concentrado proteico hidrolizado (Figura 15A). Similar al %PC, a mayor proporción de Concentrado Proteico hidrolizado, mayor %PC (Figura 15B). Para el grado de similitud, la relación es inversa, mientras mayor el Concentrado Proteico hidrolizado, menor °S (Figura 15C). Es interesante notar que el porcentaje de aditivo parece no tener influencia en las variables respuesta, excepto por el %PC cuando se requiere levemente un aumento para de igual forma elevar el %PC. Esto corrobora lo evidenciado en los ANOVA donde el aditivo fue uno de los elementos menos influyentes para explicar las variaciones en las respuestas.

Los aditivos alimentarios tienen funciones específicas, entre estas, por ejemplo, aumentar la vida útil, emulsionar ácidos grasos, adicionar textura, entre otros (Saltmarsh, 2020, Wu, 2021). En ese sentido, estos compuestos son adicionados en niveles mínimos (Wu, 2021) y se espera que no tengan impacto en la composición proximal de la mezcla. En este contexto, en el presente estudio esto fue corroborado. Además, la influencia del porcentaje de

concentrado proteico fue determinante para obtener las variaciones esperadas de las variables respuesta.

El aditivo utilizado (SIN 471) denominado MONOGLICÉRIDOS Y DIGLICÉRIDOS DE ÁCIDOS GRASOS corresponde a la clase funcional de aditivos antiespumantes, emulsificantes, agentes de glaseado y estabilizadores y la cantidad a adicionar optimizada (0.19g/100g) se encuentra dentro de lo admitido por el Codex Alimentarius, el mismo que para este aditivo establece que la cantidad a adicionar está enmarcada en las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y la cantidad de aditivo que se añada al alimento se limitará a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado; la cantidad de aditivo que pase a formar parte del alimento como consecuencia de su uso en la fabricación, elaboración o envasado de un alimento y que no tenga por objeto obtener ningún efecto físico o técnico en el alimento mismo, se reducirá en la mayor medida que sea razonablemente posible; el aditivo será de una calidad alimentaria apropiada y se preparará y manipulará de la misma forma que un ingrediente alimentario (Codex Alimentarius, 2021)



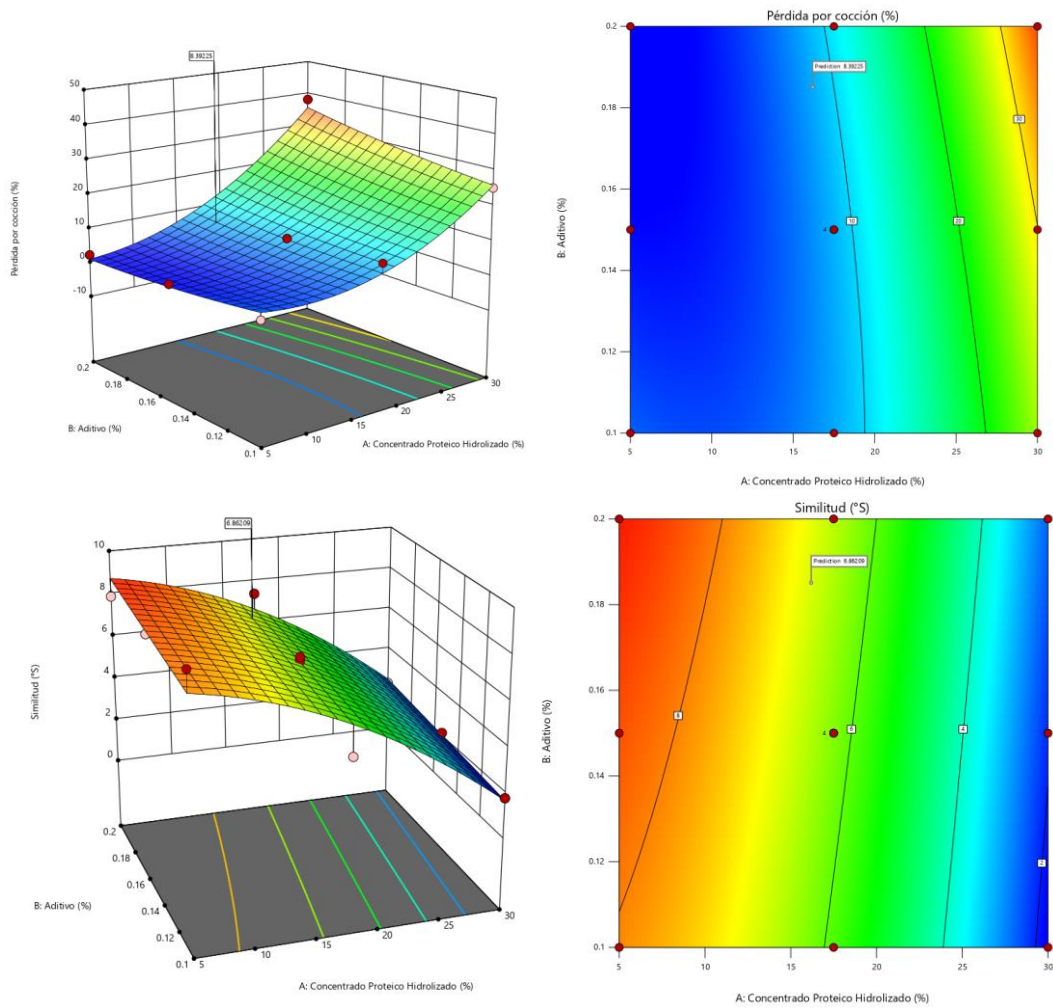


Figura 14. Gráficos de superficie de respuesta y de contorno para maximizar el %P y °S, minimizando el % PC A). Interacción aditivo sustrato para el %P. B) Interacción aditivo sustrato para el %PC. C) Interacción aditivo sustrato para el °S.

#### 4.2.4. Validación de condiciones óptimas

En la Tabla 33 se muestran la formulación empleadas para la validación experimental del perfil de optimización del %CP y %A, según los valores óptimos obtenidos por la metodología de superficie de respuesta.

Tabla 33. Formulación empleada para la validación experimental del perfil de optimización del %CP y %A

<b>Factor</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Valor</b>
<b>Formulación</b>		
Harina de arrocillo	%	83.62
Concentrado proteico hidrolizado	%	16.19
Aditivo	%	0.19
Agua (25.4 % de humedad de mezcla)	%	24.6
<b>Parámetros operacionales de extrusión</b>		
Temperatura de alimentación	°C	~40
Temperatura en zona de mezclado	°C	~80
Temperatura en zona de mezclado	°C	~75
Variador de extrusor		~30
Velocidad del dosificador		~26
Velocidad del cortador		~33

Los resultados de la validación del modelo de optimización se presentan en la Tabla 34. Los valores de %P, %PC y °S, obtenidos en la validación se ajustaron a la predicción realizada por el modelo en un intervalo de confianza del 95%. Los resultados demuestran que el modelo matemático fue capaz de predecir el comportamiento y optimizar el porcentaje de sustitución parcial de harina de arroz por concentrado proteico hidrolizado y aditivo, en función a las variables respuesta.

Tabla 34. Valores predictivos y reales experimentales de la optimización de la formulación del extruido (grano símil de arroz)

<b>Variable respuesta</b>	<b>Predicción (IC 95%)</b>	<b>Validación (IC 95%)</b>
%P	19.00	18.77
%PC	8.39	8.22

°S	6.86	6.12
----	------	------

Tabla 35. Composición proximal del grano símil de arroz enriquecido con péptidos de anchoveta, obtenido utilizando formulación optimizada.

Composición (base seca)	Media (%)
Proteína	18.77
Humedad	11.32
Ceniza	1.03
Grasa	2.32

La anchoveta como pescado es poco aceptado por el consumidor, es un pescado frágil que se deteriora rápidamente debido a su alta concentración de proteínas y grasa, lo que limita su comercialización y transporte. Además, su sabor intenso lo hace poco atractivo (IFFO, 2020). Por eso, una alternativa viable para el aprovechamiento de sus nutrientes es en hidrolizados enzimáticos (IFFO, 2020) que pueden mejorar las condiciones organolépticas del producto final y ser utilizados como suplementos en alimentos de consumo masivo como el arroz.

La aplicación de hidrolizados derivados de los organismos acuáticos han demostrado su potencial uso como suplementos nutricionales para la nutrición humana (Chalamaiah et al., 2012) por medio de la fortificación de diversos alimentos como galletas, sopas, bebidas, entre otros, debido a sus propiedades nutricionales e impacto en la textura y morfología de los productos (Chalamaiah et al., 2012; Unnikrishnan et al., 2019; Choudhuy & Gautam, 2006; Klunklin & Savage, 2018; Egerton et al., 2018;; Rivero-Pino et al., 2020) .

En ese contexto, el Contenido proteico (%P) obtenido en el grano símil de arroz fue de 18.77% (Tabla 35), es superior al contenido de proteínas de la harina de arrocillo (~ 7%), en más del 100 %. Otros estudios han elaborado extruidos con adición de proteínas de organismos hidrobiológicos con el objetivo de aumentar el valor nutricional de las mezclas.

Por ejemplo, (Tapia et al., 2023) obtuvieron entre 11.2 y 15.39 % de proteínas incluyendo harina de calamar para producir extruidos. Otros autores han mostrado que los niveles de proteínas pueden incluso superar el 40 % del valor proximal del extruido con harina de organismos acuáticos (Valenzuela-Lagarda et al., 2021). Sin embargo, no tuvieron la limitante de obtener un grano similar o una forma determinada del extruido a producir.

En comparación, la proporción de proteínas en el grano similar de arroz, obtenido de la mezcla del concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta y harina de arrocillo en este estudio, es mayor a la cantidad de proteínas de alimentos de consumo masivo como el queso fresco de vaca (17.5g/100g), leche evaporada entera (6.3/100g), huevo de gallina sancochado (12.8/100g), hígado de pollo (18.0/100g) y similar al valor proteico de la anchoveta entera (19.1/100g), pechuga de gallina (19.2/100g), carne de pollo, (21.4/100g), carne de res (21.3/100g) (Reyes-García & Gómez-Sánchez, 2018), Esto es de alta relevancia dado que el producto final obtenido es un grano fortificante similar al grano de arroz que puede ser mezclado con el grano de arroz, para su consumo de forma masiva, lo que puede ser de utilidad en regiones del país donde las proteínas del pescado son poco accesibles y donde el valor nutricional de la anchoveta puede ser aprovechado para mejorar la dieta diaria y reducir los índices de desnutrición reportados.

Asimismo, el aporte de Aminoácidos esenciales, destacando el elevado contenido de lisina (5.92 g por 100g de concentrado proteico hidrolizado en polvo) que complementa la deficiencia de este aminoácido en el arroz pilado. Sumado a ello la incorporación de Sodio, Potasio, Hierro, Fosforo y Magnesio (9.136 g/kg, 11.39 g/kg, 59.61mg/kg, 5.126 g/kg y 948.8 mg/kg, respectivamente de parte concentrado proteico hidrolizado en polvo) hacen de que el extruido (grano similar de arroz) obtenido pueda ser considerado un alimento funcional para combatir la anemia y la desnutrición crónica.



Según la Norma Técnica Peruana 209.652 para Etiquetado Nutricional de Alimentos envasados establece en los valores de referencia de nutrientes (VRN-N) que el requerimiento de proteína diaria es de 90g a más para adultos y niños mayores de 4 años según cálculo basado en la ingesta energética de referencia de 2000kcal diarios. Asimismo, de acuerdo al factor de conversión para determinar la cantidad de energía, 1 gramo de proteína aporta 4 kcal. (NTP 209.652 , 2017). Asimismo, el Protocolo para la planificación del menú escolar del Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma, un desayuno, almuerzo o cena debe contener una fuente proteina que aporte un 12% de kcal diarias requeridas (PNAEQW, 2022).

En ese sentido, tomando en consideración que el arroz es un ingrediente básico en la dieta del consumidor y este es consumido con otro alimento (menestras, tubérculo, grano, carne u otro), la potencial fortificación del mismo con un grano símil de arroz con un contenido proteico de 18.77 g/100g propio de los péptidos solubles de anchoveta incorporados, aportaría a cubrir el requerimiento diario de proteína necesario para niños y adolescentes en etapa escolar (mínimo 12%) (INS-CENAN, 2012) en una preparación culinaria a base de arroz y otros ingredientes.

La pérdida por cocción es usada comúnmente como indicador de la calidad de la pasta cocida, tanto por los consumidores como por las industrias (Tudoricá et al., 2002). En el caso de pastas la sustitución parcial de la harina del granular durum, por otras fuentes sucedáneas, repercute en la calidad de las pastas alimenticias, siendo una de ellas, la pérdida de peso durante la cocción (pérdida por cocción) no debe sobrepasar el 9 % (Hoseney, 1991), por lo que se tomó como referencia para establecer un como indicador de calidad de grano simil obtenido. En ese sentido, el grano simil obtenido reporto un valor de pérdida por cocción (8.22%) lo que lo hace aceptable en términos de calidad para garantizar la estabilidad en la cocción.

Respecto al grado de similitud, el valor reportado del grano simil obtenido con la formulación optimizada reporto el valor de 6.12 de una escala de similitud de 1 a 9 (menor grado de similitud – mayor grado de similitud respectivamente respecto al grano de arroz fortificado) destacando las siguientes dimensiones promedio (largo:7mm, espesor 2 mm) y forma similar al grano de arroz pilado. El largo se encuentra dentro de la clasificación del grano: clase grano largo de 6.6mm a más establecido según NTP 205.011:2021 ARROZ. Arroz elaborado. Requisitos. Asimismo, es preciso resaltar que el valor obtenido no considera la evaluación de color toda vez que este varia respecto al grano de arroz por el uso del concentrado proteico hidrolizado en polvo. Sin embargo, el grado de similitud obtenido supera el valor planteado en la hipótesis del estudio brindado la opción de ser mezclado en cualquier tipo y presentación del arroz (arroz añejo, arroz parbolizado, arroz integral y arroz pilado).

#### **Determinación de vida útil del grano simil**

Las pruebas aceleradas al que se sometió el producto, determinaron que el tiempo de vida útil del producto almacenado a una temperatura de 25 °C fue de 365 días equivalente a 12 meses, los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos, físico químicos y sensoriales se detallan en el Anexo 10.

Ello hace considerar al producto como apto para el consumo humano durante 12 meses. Un estudio similar en el cual incluyeron en un extruido 15 % de harina de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) y 85 % de maíz, hallaron que el tiempo de almacenamiento se extendió por 7 meses y medio (28 semanas). Durante ese tiempo no se evidenciaron cambios morfológicos ni microbiológicos en el producto (Shahmohammadi et al., 2015). En el presente estudio utilizando anchoveta, no se presentaron valores a nivel microbiológico que pongan en riesgo la inocuidad y el tiempo de vida estimado para el producto.

La evaluación del tiempo de vida útil se realizó en función de la evaluación sensorial y aplicando la ecuación de Arrhenius se obtiene el tiempo de vida útil del producto. Al respecto, los productos del pescado son de los más sensibles al almacenaje (Ozogul et al., 2010). Algunos estudios han demostrado que el contenido de humedad, el contenido de agua y ácidos grasos incrementan durante el almacenaje (Nkubana& Dusabumuremyi, 2019)

El resultado de vida útil (12 meses) obtenido como resultado de las pruebas aceleradas, evidencian la duración de alimento en condiciones de almacenamiento optimas, en envases impermeables y que bloquen la luz, dado a la característica higroscópica que presenta el producto y su fotosensibilidad.



Figura 15. Grano símil obtenido con de formulación optima a escala industrial

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- a) Los parámetros óptimos de concentración de enzima, sustrato, y tiempo de reacción para maximizar el rendimiento de péptidos solubles al valor de 8 Bx ref. fueron de Corolase 8000® = 0.085g/100g anchoveta entera y Corolase 7090®= 0.275/100g anchoveta entera, 0.45% de sustrato y un tiempo de reacción de 31.87 min. Reportando valores validados bajo condiciones industriales de: 7.91 Brix ref, 33.8 %SI de y 2.32%G.
- b) El porcentaje óptimo de sustitución de harina de arrocillo por concentrado proteico hidrolizado en polvo de *Engraulis ringens* en la formulación de un grano símil de arroz obtenido por extrusión maximizando el contenido proteico, con un menor porcentaje de perdida por cocción y un mayor grado de similitud con el grano de arroz pilado fue de: 16.19% concentrado proteico hidrolizado, 0.19% de aditivo y un 83.64% de harina de arrocillo. Reportando valores validados bajo condiciones industriales de: de 18.77% de Contenido proteico, 8.22% de Perdida por cocción un 6.12% de grano de similitud respecto al grano de arroz.
- c) La formulación optima del extruido obtenido (grano símil de arroz) presento un porcentaje de perdida por cocción de 8.22 %, un grano de similitud respecto al grano de arroz de 6.12 y un contenido proteico de 18.77%, cuyos valores bajo condiciones industriales que fueron similares a los previstos en el modelo de optimización, reportando un tiempo de vida útil del producto almacenado a 25 °C de 345 días y valor proteico por encima de otros alimentos de consumo masivo como la leche evaporada entera, huevo de gallina y queso fresco de vaca.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- a) Desarrollar estudios para la aplicación del hidrolizado proteico de anchoveta entera en su presentación líquida directa al proceso de extrusión, a fin de optimizar costos de producción.
- b) Desarrollar estudios respecto a la optimización de parámetros operaciones de extrusión para para la producción del grano símil enriquecido con concentrado proteico de anchoveta considerando la formulación optimizada en el presente estudio.
- c) Evaluar otras alternativas de aditivos alimentarios que aporten a brindar mayor firmeza al grano símil obtenido para ampliar las alternativas de uso del grano símil obtenido durante las preparaciones culinarias.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

- AACC, A. C. (1962). American Association of Cereal Chemists. Approved Methods Committee. (1962). Approved Methods of the AACC.
- ABenzymes. (2023). AB Enzymes an ABF Ingredients company. Obtenido de home - Corolase®8000: <https://www.abenzymes.com/en/product-repository-food/corolase-8000/>
- Abuine, R., Rathnayake, A. U., & Byun, H. G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and aquatic sciences*, 22(1), 1-14.
- Agencia Agraria Noticias. (2022). Consumo per cápita de arroz en Perú alcanza un volumen aproximado de 61 kilos. Obtenido de <https://agraria.pe/noticias/consumo-per-capita-de-arroz-en-peru-alcanza-un-volumen-aprox-28976>
- Agroportunidades. (2023). Portal web. Obtenido de Agroportunidades, comercializadora de arroz y subproductos del arroz: <https://agroportunidades.com/index.html#features13-x>
- Amiza, M. A., Nurul Ashikin, S., & Faazaz, A. L. (2011). Optimization of enzymatic protein hydrolysis from silver catfish (*Pangasius sp.*) frame. *International Food Research Journal*, 18(2).
- AOAC (2019). Official Methods of Analysis. Method: 937.09 Salt (Chlorine as Sodium Chloride) in Seafood. Volumetric Method. Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC (2019). Official Methods of Analysis. Method 942.05: Ash of Animal Feed, 21st Edition, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC (2019). Official Methods of Analysis. Method 975.08 Fluorine in Animal Feed, 21st Edition, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC (2016). Official Methods of Analysis, Method: Heavy Metals in Food. 21st Edition, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC (2012). Official Methods of Analysis, Method: Free Fatty Acids. Official Journal of the European Communities 19.9.98, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC (1999) 18th. Ed. Method: 971.09-1973 Pepsin Digestibility of Animal Protein Feeds
- Aspevik, T., Egede-Nissen, H., & Oterhals, L. (2016). A systematic approach to the comparison of cost efficiency of endopeptidases for the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 421.
- Azizi Khesal, M., Sharifan, A., Hoseini, E., & Ghavami, A. (2020). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) " by-product for production of bioactive peptides with antioxidative properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1829-1838.
- Baez-Suarez, A. J., Ospina-de-Barreneche, N., & Zapata-Montoya, J. E. (2016). Efecto de temperatura, pH, concentración de sustrato y tipo de enzima en la hidrólisis

enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis* spp.). Información tecnológica, 27(6), 63-76.

- Balindong, J. L., Ward, R. M., Liu, L., Rose, T. J., Pallas, L. A., Ovenden, B. W., ... & Waters, D. L. (2018). Rice grain protein composition influences instrumental measures of rice cooking and eating quality. *Journal of Cereal Science*, 79, 35-42.
- Barrett, A. J. (Ed.). (1994). *Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases* (Vol. 1). San Diego: Academic Press.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Bertelsen, A. S., Laursen, A., Knudsen, T. A., Møller, S., & Kidmose, U. (2018). Bitter taste masking of enzyme-treated soy protein in water and bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3860-3869.
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. *Antioxidants and functional components in aquatic foods*, 237-281.
- BRF ingredients. (2022). BRF ingredients. Obtenido de Los beneficios de la hidrólisis enzimática en la formulación de los alimentos de alto rendimiento: <https://www.brfindredients.com/es/blog/posts/los-beneficios-de-la-hidrolisis-enzimatica-en-la-formulacion-de-alimentos-de-alto-rendimiento/>
- Bruce, R. M., Atungulu, G. G., & Sadaka, S. (2020). Physicochemical and functional properties of medium-sized broken rice kernels and their potential in instant rice production. *Cereal Chemistry*, 97(3), 681-692.
- Inungaray, M. L. C., & Reyes, A. (2013). Vida útil de los alimentos. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA*, 2(3), 3.
- Centro Nacional de Alimentación y Nutrición - CENAN (2015). *Requerimiento de energía para la población peruana*. Lima: Ministerio de Salud- MINSa.
- Centro para los servicios de información y asesoramiento sobre comercialización de los productos pesqueros de América Latina y el Caribe -INFOPEsCA. (2023). *Economía Mundial del Sector Pesquero del 2022*. Obtenido de <https://www.infopesca.org/content/econom%C3%ADa-mundial-del-sector-pesquero-%E2%80%934-de-2022>.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, 135(4), 3020-3038.
- Chi, C. F., Wang, B., Hu, F. Y., Wang, Y. M., Zhang, B., Deng, S. G., & Wu, C. W. (2015). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*, 73, 124-129.
- Choudhury, G. S., & Gautam, A. (2003). Hydrolyzed fish muscle as a modifier of rice flour extrudate characteristics. *Journal of Food Science*, 68(5), 1713-1721.

- Codex Alimentarius (2021). Norma General para Aditivos Alimentarios CODEX STAN 192-1995. Revisión 2021. Pag. 4 y 238.
- Colina, J., & Guerra, M. (2009). Obtención y evaluación de arroz integral de cocción rápida. *Interciencia*, 34(10), 736-741.
- Congreso de la Republica del Perú. (18 de agosto de 2021). Diario el Peruano. Ley N°31348, Ley que propone el enriquecimiento del arroz en el Perú, pág. 6.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254-262.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (19), e899.
- Decreto Supremo N° 015-84-SA. (1984). Decreto Supremo que declara que las empresas dedicadas al procesamiento de la sal de consumo humano están obligadas a añadir fluor a dicho producto. Lima, Peru: Ministerio de Salud-MINSA
- De Pee, S., Fabrizio, C., & Rosenzweig, J. (2014). Overview of evidence and recommendations for effective large-scale rice fortification. *Scaling up Rice Fortification in Asia*, Sight and Life, 20-25.
- Decreto Ley N° 17387. (21 de enero de 1969). Obligatoria producción de sal yodada en el territorio tanto para consumo humano como Animal. Lima, Perú: Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social.
- DFGrupo. (26 de mayo de 2023). DFGrupo Nutriendo la Tierra. Obtenido de La importancia mundial del arroz: <https://www.dfgrupo.com/la-importancia-mundial-del-arroz/>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food chemistry*, 245, 698-706.
- Espinoza, D., & Castillo, A. (2022). Avances tecnológicos en la obtención, identificación y producción de hidrolizados proteicos de residuos de pescado por acción enzimática: propiedades bioactivas y tecnofuncionales, aplicación en alimentos, mercado y regulación. *Scientia Agropecuaria*, 13(2), 135-148.
- Espinoza, K., Acero, D. J. R., & Martínez, N. (2021). Elaboración de Snack extruido a partir de Cereales y Concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) y determinación de su vida útil. In *Anales Científicos* (Vol. 82, No. 1, pp. 180-191). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- FAO (2022). Informe de las Naciones Unidas: las cifras del hambre en el mundo aumentaron hasta alcanzar los 828 millones de personas en 2022. Obtenido de <https://www.fao.org/newsroom/detail/un-report-global-hunger-SOFI-2022-FAO/es#:~:text=Tras%20permanecer%20relativamente%20sin%20cambios,9%2C3%20%25%20en%202020>.
- FAO (2014). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.. Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición. Obtenido de



[https://www.fao.org/documents/card/en/c/9e4fd85a-e700-4fbe-9bba-  
dfa261c2a712/](https://www.fao.org/documents/card/en/c/9e4fd85a-e700-4fbe-9bba-dfa261c2a712/).

- Food and Drug Administration - FDA (1998). Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Online, 8th Edition, Revision A, Chapter 10, A (3-7), B, C,D.1 (a,b), E, G, H (1.a). Excepto laprueba de CAMP, H (2a).
- Gildberg, A. (1993). Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochemistry*, 28(1), 1-15.
- Gimferrer, N. (2009). Fundación Eroski. Obtenido de Extrusión de alimentos, dar nuevas formas y textura: <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/extrusion-de-alimentos-dar-nuevas-formas-y-texturas.html>.
- Guo, Y., Michael, N., Fonseca Madrigal, J., Sosa Aguirre, C., & Jauregi, P. (2019). Protein hydrolysate from *Pterygoplichthys disjunctivus*, armoured catfish, with high antioxidant activity. *Molecules*, 24(8), 1628.
- Guy, R. C. E. (2001). Raw materials for extrusion cooking processes. In *The technology of extrusion cooking* (pp. 52-72). Boston, MA: Springer US.
- Herawati, T., Yustiati, A., Nurhayati, A., & Mustikawati, R. (2018, April). Proximate composition of several fish from Jatigede Reservoir in Sumedang district, West Java. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 137, No. 1, p. 012055). IOP Publishing.
- HIVinfo. (2021). Glosario de terminos realacionados al VIH. Clinical info HIV.gob, 9 edición, Pag 143. Obtenido de Glosario de Teminos relacionados con el VIH.
- Hoseney, R. C. (1991). *Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales*. Acribia. p.269-274.
- ICMSF. (2000). Método de Recuento de Levaduras y Mohos por siembra en placa en todo el medio. Acribia, 2da. Ed. Pág. 166-167.
- ICMSF. (2000). 2ªedición, Microorganismos de los alimentos 1. Enterobacteriaceae Recuento por siembra en placa. Acribia, Pág. 149-150.
- IFFO la organizaciòn de los ingredientes marinos. (diciembre de 2020). Anchoqueta Peruana ¿Por que es utilizada para alimento balanceado y no como alimento? Obtenido de <https://www.iffco.com/es/node/98>
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2021). Norma Tecnica Peruana. NTP 205.011 2021. ARROZ. Arroz elaborado. Requisitos. Lima. Peru
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2017). Norma Tecnica Peruana NTP 209.652 . ALIMENTOS ENVASADOS. Etiquetado nutricional. Resolución Directoral N° 011-2017-INACAL/DN. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2018). NTP 205.005: 2018 CEREALES Y MENESTRAS. Cereales. Determinación de proteínas totales (método de Kjeldahl). Lima, Perú.

- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2010). NTP 204.033:1985 (Revisada el 2010). HARINA DE PESCADO. Det. del extracto del hexano (Mét. de rutina) y del extracto de éter dietílico. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2019). NTP 209.264:2018. ALIMENTOS COCIDOS DE RECONSTITUCIÓN INSTANTÁNEA. Determinación de humedad. Método gravimétrico. 3a Edición. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2022). NTP 209.266:2012 (revisada el 2021). ALIMENTOS COCIDOS DE RECONSTITUCIÓN INSTANTÁNEA. Determinación de acidez. Método volumétrico. 2ª Edición. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad – INACAL (2018). NTP ISO 5983:2002 (revisada el 2018), ALIMENTOS PARA ANIMALES. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculos del contenido de proteína cruda. Método Kjeldah. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad – INACAL (2019) NTP-ISO 4121:2008 (revisada el 2019), Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. 1ª Edición. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Calidad - INACAL (2022). NTP-ISO 6496 (Revisada el 2022), NTP-ISO 6496 Excepto 8.4 (Revisada el 2022). 2011 ALIMENTOS PARA ANIMALES. Determinación del contenido de. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de la Salud-CENAN (2012). Propuesta Técnica Requerimientos de energía y recomendaciones de nutrientes para la población de 3 a 14 años INS/CENAN/DEPRYDAN.
- Inductively Coupled Plasma, I. (1994). Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometric. Method for trace element analysis of water and wastes. Appendix C, Part, 136, 40.
- Industrias Ralda. (2023). Obtenido de Materias primas para la alimentación animal: <https://www.iralda.com/productos/arroz-partido/>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática- INEI. (2018). Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDES). Informe anual. Lima, Perú.
- ISO (2019). Animal feeding stuffs. Determination of amino acids content. reviewed and confirmed in 2019.
- ISO (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella – Part 1: Detection of Salmonella spp. First edition (Excepto item 9.3.3; 9.4.3 y Annex D).
- Instituto de Salud Pública- ISP (2020). ISP - 021. Determinación de la Densidad Aparente y Compacta en Harina de Productos Hidrobiológicos. Chile.
- Instituto Tecnológico de la Producción - ITP (2018). Patente N° Resolución N° 1332-2018-DIN-INDECOPI. Lima. Perú

- Jang, H. J., Kim, M. C., Jung, E. M., Shin, E. C., Lee, S. H., Lee, S. J., ... & Lee, Y. B. (2005). Optimization and flavor quality of enzymatic hydrolysate from dark muscle of skipjack. *Preventive Nutrition and Food Science*, 10(1), 11-16.
- Jiménez Revilla, R. L., & Sanchez Moncada, B. J. (2023). Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas del proceso de hidrólisis de proteínas de Anchoveta Peruana (*Engraulis ringens*) con proteasas comerciales.
- Kakko, T., Damerau, A., Nisov, A., Puganen, A., Tuomasjukka, S., Honkapää, K., ... & Yang, B. (2022). Quality of protein isolates and hydrolysates from Baltic Herring (*Clupea harengus membras*) and Roach (*Rutilus rutilus*) produced by pH-shift processes and enzymatic hydrolysis. *Foods*, 11(2), 230.
- Kari, N. M., Ahmad, F., & Ayub, M. N. A. (2022). Proximate composition, amino acid composition and food product application of anchovy: a review. *Food Research*, 6(4), 16-29.
- Kawakatsu, T., & Takaiwa, F. (2019). Rice proteins and essential amino acids. In *Rice* (pp. 109-130). AACC International Press.
- Kiple, K. F., & Kriemhild, C. O. (2000). *Cambridge World Encyclopedia of Food, Volume I, Animal, Marine and Vegetable Oils*.
- Klunklin, W., & Savage, G. (2018). Physicochemical properties and sensory evaluation of wheat-purple rice biscuits enriched with green-lipped mussel powder (*Perna canaliculus*) and spices. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Kristinsson, H. G. (2007). Aquatic food protein hydrolysates. In *Maximising the value of marine by-products* (pp. 229-248). Woodhead Publishing.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 43-81.
- Kudale, R. G., & Rathod, J. L. (2015). Nutritional value of fringe scale sardine, *Sardinella fimbriata* (Cuv. and Val.) from Karwar waters. *Int. J. Fish Aquat. Stud*, 3, 6-9.
- Lamas, D., & Agueda, E. M. (2022). Hidrólisis enzimática de residuos del procesamiento de surel (*Trachurus lathami*): caracterización de las fracciones obtenidas. *Revista Científica*, 30(2).
- Ley N° 28314. (2004). Ley que dispone la fortificación de todas las harinas de trigo de producción nacional, importadas y/o donadas, que se consumen en el país, con micronutrientes como el hierro, ácido fólico, niacina y las vitaminas B1 (tiamina) y B2 (riboflavina). Lima, Perú: Ministerio de Salud.
- Lima, K. O., da Rocha, M., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Tovar, C. A., Gómez-Guillén, M. C., ... & Prentice, C. (2021). Yogurt fortification by the addition of microencapsulated stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) protein hydrolysate. *Antioxidants*, 10(10), 1567.
- Martínez, J., Hernández, J., & Arias, A. (2017). Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de arroz (*Oryza sativa* L) blanco e integral *Physicochemical and*

- functional properties of white and brown rice (*Oryza sativa* L) starch. *Alimentos Hoy*, 25(41), 15-30.
- Milani, P., Fabrizio, C., & Rosenzweig, J. (2017). Introduction to rice fortification. Scaling Up Rice Fortification in Latin American and the Caribbean. Sight and Life/World Food Programme.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - MIDAGRI. (2020). Arroz fortificado para combatir la desnutrición. Obtenido de <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/27307-arroz-fortificado-para-combatir-la-desnutricion>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - MIDAGRI. (2023). Boletín trimestral N° 02-2023, Observatorio de Commodities-Arroz. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5221699/Commodities%20Arroz%20abr-%20jun%202023.pdf?v=1696354092>.
- Ministerio de la Producción. (2023). Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2022. PRODUCE-PERU, Perú.
- Ministerio de Salud - MINSA. (2022). Consumo masivo de arroz fortificado en el Perú cada vez más cerca de ser una realidad. Obtenido de <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/584819-consumo-masivo-de-arroz-fortificado-en-el-peru-cada-vez-mas-cerca-de-ser-una-realidad>
- Ministerio de Salud - MINSA. (2018). Resolución Ministerial N° 745-2018/MINSA. Aprobación de tres (03) Fichas de Homologación del arroz fortificado. Lima, Perú.
- Ministerio de Salud - MINSA. (2022). Resolución Ministerial N° 564-2022/MINSA . Fichas de Homologación del arroz fortificado. Lima, Perú.
- Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., & Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 4349-4358.
- Montero-Barrantes, M. (2021). Hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera: obtención y funcionalidad. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 681-699.
- Mudarra, R. (2022). Funciones Bioactivas De Péptidos Derivados De Proteínas Hidrolizadas De Pescado:: Aplicación En La Nutrición Porcina. Revisión. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 4(2), 121-136.
- Muthayya, S., Sugimoto, J., Montgomery, S., Maberly, G. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 7-14, <https://doi.org/10.1111/nyas.12540>.
- Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from muscles of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* using response surface methodology. *Amino Acids*, 43, 337-345.

- Najar, C., & Merino, J. A. (2007). Mejoras en el proceso productivo y modernización mediante sustitución y tecnologías limpias en un molino de arroz. *Industrial data*, 10(1), 22-32.
- Nava, F., & Delgado, L. (2018). Contribución de arroz para la seguridad alimentaria y nutrición y el aprovechamiento de oportunidades para la sostenibilidad, la nutrición y los resultados de salud. *Revista Técnica del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*, 4-5.
- National Cancer Institute - NCI. (2023). web site NCI. Obtenido de NCI Cancer Dictionary: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/enriched-food>.
- NCh 2637:2001 (Modificado el 2021), (2021). Productos hidrobiológicos - Determinación de histaminas y otras aminas biógenas - Método HPLC con detector UV. Chile: Instituto Nacional de Normalización.
- Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 452-459.
- Nielsen, P. M. (2001). Improved Method for Determining . *Food Chemistry and Toxicology*, 66(5), 642-646.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2015). CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. Determinación del Contenido de Nitrógeno Amoniacal (TBVN). Perú.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Roma.
- Ozogul, Y., Ayas, D., Yazgan, H., Ozogul, F., Boga, E. K., & Ozyurt, G. (2010). The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. *International journal of food science & technology*, 45(8), 1717-1723.
- Pandia, S., Solari, A., Albrecht-Ruiz, M., & Salas, A. (2013). Hidrólisis Enzimática de Residuos de Anchoqueta y Anchoqueta Entera a Nivel Piloto y Caracterización de sus Productos. *Bolétín de Investigación del Instituto Tecnológico de Producción*, 11, 21-28.
- Paredes, M., Becerra, V., & Donoso, G. (2021). Capítulo 12. Historia de la producción de arroz en Chile. 1920-2020. 100 años Del Cultivo Del Arroz En Chile En Un Contexto Internacional, 314.
- Pariona-Velarde, D., Maza-Ramírez, S., & Ayala Galdos, M. (2020). Nutritional characteristics of a Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) protein concentrate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29(7), 707-719.
- Penagini, F., Dilillo, D., Meneghin, F., Mameli, C., Fabiano, V., & Zuccotti, G. V. (2013). Gluten-free diet in children: an approach to a nutritionally adequate and balanced diet. *Nutrients*, 5(11), 4553-4565.
- Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma- PNAEQW (2023). Precios de arroz y arroz fortificado del PNAEQW en el año 2022 y 2023.

- Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma- PNAEQW, (2023). Especificaciones Técnicas de L Arroz fortificado. Versión N°03. Lima, Perú: RDE N°000541-2023-MIDIS/PNAEQW-DE.
- Ministerio de la Producción- PRODUCE, (2022). Instituto Tecnológico de la Producción. Obtenido de Elaboran concentrado proteico de anchoveta para combatir la desnutrición infantil: <https://www.gob.pe/institucion/itp/noticias/607909-elaboran-concentrado-proteico-de-anchoveta-para-combatir-la-desnutricion-infantil>
- Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma. (2022). Protocolo para la Planificación del Menú Escolar del Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma. Versión N° 04. Lima, Perú: RDE N°000221-2022-MIDIS/PNAEQW-DE.
- Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura -PNIPA. (2021). Cadena de valor de la anchoveta para consumo humano directo. Obtenido de <file:///C:/Users/User/Downloads/ANCHOVETA%2005.08.pdf>.
- Pesquera Exalmar S.A.A. (2023). Productos de consumo humano indirecto. Harina y aceite de pescado. <https://www.exalmar.com.pe/productos/productos-consumo-humano-indirecto/> consultado 10.09.2023.
- Ramírez-Navas, (2012). Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. Revista ReCiTeIA. 12. 83-102.
- Rivero-Pino, F. E.-C. (2020). Evaluation of the bioactive potential of foods fortified with fish protein hydrolysates. *Food Research International*, 2-5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109572>.
- Rodríguez-Vasquez, R.M.P. (2020). Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds. *Food Chemistry*, 315, 126293.
- Roldán, A., Omote-Sibina, J., & Molleda, O. (2021). Elaboración de un hidrolizado de proteína de anchoveta (*Engraulis ringens*) en polvo. *Anales Científicos*, 82(2), 251-261. doi:<https://doi.org/10.21704/ac.v82i2.1787>.
- Sabotič, J., & Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1351-75. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>.
- Rohman, A., Helmiyati, S., Hapsari, M., & Larasati Setyaningrum, D. (2014). Rice in health and nutrition. *International Food Research Journal*, 21(13-24).
- Saleem, A., Hussain, A., Chaudhary, A., Ahmad, Q., Iqtedar, M., & Javid, A. &. (2020). Acid hydrolysis optimization of pomegranate peels waste using response surface methodology for ethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1513–1524.
- Saltmarsh, M. (2020). Chapter 1: Food Aditives and why they are used. En *Saltmarsh's Essential Guide to Food Aditives* (págs. 1-9). doi:<https://doi.org/10.1039/9781839161063>.

- Samamé, Z. (2016). Optimización de una galleta enriquecida con hidrolizado de anchoveta (*eugraulis ringens*) aplicando metodología de superficie respuesta. *Agroindustrial science*, 128-134.
- Senadheera, T. D. (2021). Antioxidant potential and physicochemical properties of protein hydrolysates from body parts of North Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Food Production, Processing and Nutrition*, 3-22.
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA (2020). Registro de Cultivares Comerciales Sistematizados . ARROZ (*Oryza sativa L.*). Lima, Perú.
- Shahmohammadi, H. J. (2015). Studying the Effects of Fish Muscle Incorporation on Storage Stability of a Novel Corn-fish Snack. *Journal Food Quality*, 1745-4557. doi:<https://doi.org/10.1111/jfq.12173>.
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S. K., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69-78. doi:<https://doi.org/10.1089/ind.2018.0032>.
- Sifuentes, G. (2023). Know How Colpex International SAC. Comunicación personal de julio del 2023. Chimbote- Perú
- Sifuentes-Penagos, G., Leon, S., & Castillo, A. (2018). Hidrólisis de las proteínas de anchoveta (*Engraulis ringens*) entera por acción de la enzima Protamex™. *Scientia Agropecuaria*, 9 (1); 93-102. doi:<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.10>.
- Singh, R. A. (2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, ISSN 2348-7658.
- Som, B. P. (2019). Fissured grain and head rice yield of crops harvested manually or by combine at different ripening stages in Cambodia. *Plant Production Science*, 88-97.
- Suárez, M., Kizlansky, A., & López, L. (2006). Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculándose el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, Buenos Aires: s.n., 2006, Vol. 21, págs. 47-51.
- Tapia, M., Marimón, S., & Salazar, N. (2023). Development of Extruded Snacks with Protein Hydrolysed from Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) by-Product and Cañihua. *Biology and Life Sciences Forum*, 25, 4. doi:<https://doi.org/10.3390/blsf2023025004>.
- Tecnologica de Alimentos-TASA, (2023). TASA web site. Obtenido de <https://www.tasa.com.pe/productos-y-servicios-la-anchoveta.html>.
- Tudorica, C.; Kuri, V. y Brennan, C. (2002). Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:347-356
- Rao, P. B. (2020). Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate. *Journal of food Science and Technology*, 57(12):4562-4575. doi:10.1007/s13197-020-04495-2.

- Reyes-García, M., & Gómez-Sánchez, I. (2018). Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima, Perú: Insituto Nacional de Salud-INS. Obtenido de <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/20.500.14196/1034/tablas-peruanas-QR.pdf>.
- Servicio Nacional de Sanidad Pesquera -SANIPES (2016), Manual de Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación, aprobado por RDE N° 057-2016- SANIPES-DE, Perú.
- Tegge, G. (2004). Stärke und Stärkederivate. 3. vollständig überarbeitete Auflage Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG.
- Theron, L., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1),. doi:10.1007/s00253-014-6035-6
- Unnikrishnan, P. P. (2019). Protein hydrolysate from yellowfin tuna red meat as fortifying and stabilizing agent in mayonnaise. *Food Science and Technology*, 413–425. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04069-x>
- Valenzuela-Lagarda, J. L., Pacheco-Aguilar, R., Gutiérrez-Dorado, R., Mendoza, J. L., López-Valenzuela, J. Á., Mazorra-Manzano, M. Á., & Muy-Rangel, M. D. (2021). Interaction of squid (*Dosidicus giga*) mantle protein with a mixtures of potato and corn starch in an extruded snack, as characterized by FTIR and DSC. *Molecules*, 26(7), 2103.
- Valerio, J., Pandia, S., Gallo, M., & Pizardi, C. (2023). Optimización de la hidrólisis enzimática de anchoveta (*Engraulis ringens*) para minimizar el amargor. *Información Tecnológica*, 31-46.
- Wenhan, Y. Y. (2019). Effect of extrusion processing on the microstructure and in vitro digestibility of broken rice. *LWT - Food Science and Technology*, 1-20.
- WFP, World Food Programme. (15 de noviembre de 2019). Handbook for the Production of Extruded Fortified Rice Kernels. Obtenido de <https://www.wfp.org/publications/handbook-production-extruded-fortified-rice-kernels>.
- WHO, W. H. (15 de may de 2018). Guideline: fortification of rice with vitamins and minerals as a public health strategy. Obtenido de *Nutrition and Food Safety*: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550291>.
- Wu, L. (2021). Chapter 7- Analysis of food Additives. En *Innovative Food Analysis* (págs. 157-180). ISBN 9780128194935. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819493-5.00007-8>.
- Xu, Q. H. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 399-411.



Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6, 1-19.

## VII. ANEXOS

### ANEXO N° 1: Fichas Técnicas de proteasas comerciales Corolase 8000 y Corolase 7089

#### COROLASE® 8000

COROLASE® 8000 is a fungal alkaline protease enzyme preparation, primarily applied for animal protein. It is ideal for hydrolysing proteins under neutral to alkaline conditions and is used to achieve a high degree of hydrolysis.

[CONTACT US](#)

##### Application

COROLASE® 8000 is a very versatile product with excellent performance on animal protein. It is a thermo-tolerant product, which is active over a broad pH and temperature range.

COROLASE® 8000 is primarily applied for animal protein hydrolysis. Typical applications include the extraction of gelatin and hydrolysis of collagen, recycling of meat cut-offs and the recovery of fish protein from by-products of the fishing industry.

The product may be used either on its own or in combination with other proteases or enzyme activities.

##### Benefits

- High activity over a broad pH range and at elevated temperatures of up to 80°C
- Fast and cost-efficient performance in meat and fish protein hydrolysis
- Microbially stable and fast industrial processing can be ensured due to high temperatures of up to 80°C
- Very fast viscosity reduction in animal protein processing
- Patent protected by AB Enzymes
- Works synergistically with COROLASE® 7089 to achieve low molecular weight peptides of <2000Da

##### Details

Declared enzyme: Alkaline fungal protease

pH-range: 6.0 - 11.0

Temperature range: up to 80°C

Physical form: Liquid

Quality grade: Food grade

##### Application examples

- Used for partial or extensive hydrolysis of proteins
- Meat hydrolysates
- Meat recovery from bones
- Fat rendering and fat recovery from slaughterhouse waste
- Fish and seafood processing
- Fish concentrate
- Fish stick-water concentrate production
- Fish meal production
- Gelatin, collagen hydrolysates

<https://www.abenzymes.com/en/product-repository-food/corolase-8000/>

COROLASE® 8000 | Alkaline protease | Protein hydrolysis | AB Enzymes - AB Enzymes

#### COROLASE® 7089

COROLASE® 7089 is a liquid-formulated, bacterial endopeptidase enzyme preparation. The product is characterised by its ability to hydrolyse a broad range of substrates, at neutral pH.

[CONTACT US](#)

##### Application

COROLASE® 7089 is used for the hydrolysis of proteins from several animal and plant sources. It hydrolyses high-molecular-weight proteins into low-molecular-weight peptides. Typical applications include the production of hydrolysates from wheat gluten, soy protein, gelatin or collagen, but also the recovery of animal protein from by-products. It is ideally suited for protein hydrolysis applications without pH adjustments, preferably around a neutral pH.

COROLASE® 7089 may be used either as a single enzyme or in combination with other proteases depending on the targets to be achieved.

##### Benefits

- Classical bacterial endo-protease to be applied across a variety of plant and animal proteins
- Very good flavour profile, particularly for hydrolysates from animal proteins such as collagen
- For high degree hydrolysis the product works synergistically with COROLASE® 8000

##### Details

Declared enzyme: Bacterial endo-protease

pH-range: 5.5 - 8.5

Temperature range: up to 60°C

Physical form: Liquid

Quality grade: Food grade

##### Application examples

- Production of collagen peptides
- Recovery of animal protein from by-products
- Fish meal/stick water
- Krill processing
- Plant protein hydrolysates
- Plant protein modification for their optimised use in ice cream, milk alternatives and others

<https://www.abenzymes.com/en/product-repository-food/corolase-7089/>

COROLASE® 7089 | Neutral protease | Protein hydrolysis | AB Enzymes - AB Enzymes

Fuente: *AB Enzymes* (2023).

## ANEXO N° 2 Flujo del proceso productivo del concentrado proteico hidrolizado de anchoveta, en polvo.

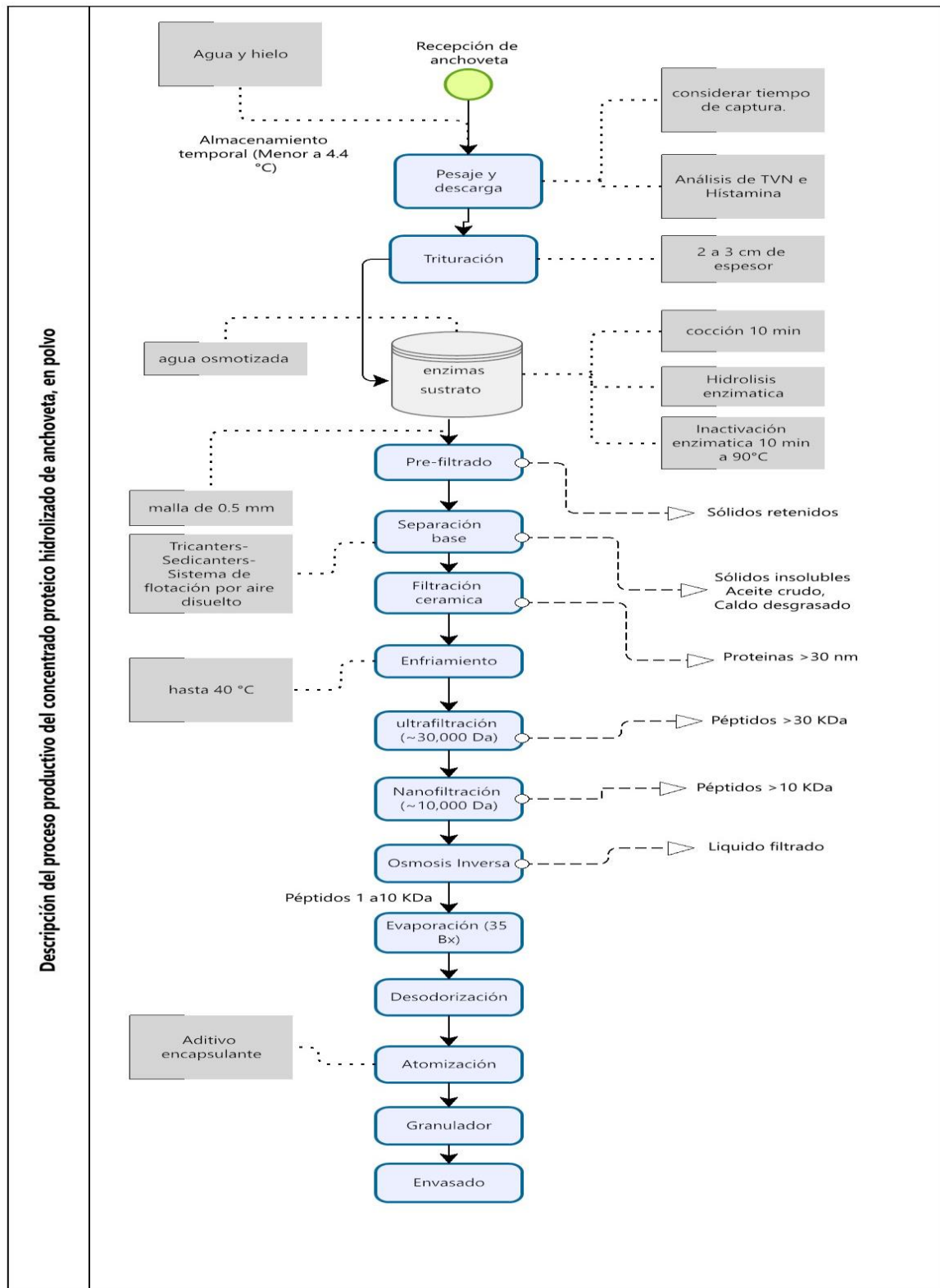


Figura 16. Flujo del proceso productivo del concentrado proteico hidrolizado de pescado en polvo implementado por Colpex International S.A.C.

### **ANEXO N° 3 Cuantificación de actividad enzimática usando caseína como sustrato (Cupp-Enyard, 2008)**

#### **i. Lista de reactivos utilizados**

- Caseína de leche bovina
- Carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Ácido tricloroacético (TCA).
- L-Tirosina base libre.
- Fosfato dipotásico trihidratado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).
- Acetato de Sodio  $3\text{H}_2\text{O}$ .
- Acetato de Calcio hidrato.
- NaOH 1 M
- HCl 1 M.
- Reactivo Fenol Folin's (Folin y Ciocaltea's) 0.5mM.

#### **ii. Procedimiento realizado**

- Añadir 5 ml de solución de caseína 0.65% p/v en 4 tubos de ensayo e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 minutos
- Añadir el volumen de enzima. Agitar e incubar durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .
- Añadir 5 ml de TCA a cada tubo para la inactivación de la reacción enzimática
- Añadir un volumen de solución de enzima para completar 1 ml e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos
- Filtrar los ensayos a través de filtros de jeringa ( $0.45 \mu\text{m}$ ) y traspasar 2 ml de filtrado a nuevos tubos.
- Añadir 5 ml de carbonato de sodio 500 mM y 1 ml de reactivo de Folin y Ciocaltea's 0.5 mM. Agitar e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.
- Filtrar los ensayos a través de filtros de jeringa ( $0.45 \mu\text{m}$ )

- Realizar la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a longitud de onda de 660 nm.

### iii. Preparación de la curva de calibrado

- Disponer de 6 tubos de ensayo. Añadir volúmenes del estándar de tirosina 1.1 mM en un rango de 0.05-0.5 ml y completar con agua destilada hasta 2 ml según la tabla N° 36

Tabla 36. Procedimiento del ensayo de cuantificación de actividad enzimática proteasa.

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

- Tras realizar la serie de diluciones estándar de tirosina, seguir los pasos f, g y h del apartado anterior.
- Determinar la absorbancia total mediante la diferencia entre la absorbancia medida de los estándares y el blanco según la ecuación 10:
- Realizar la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a longitud de onda de 660 nm.

$$A_{660nm}(std)TOTAL = A_{660nm}(std) - A_{660nm}(Blanco) \text{ [Eq. 10]}$$

- Graficar una curva de calibración de Abs<sub>600nm</sub> (eje y) vs. concentración de tirosina (eje x), considerando las concentraciones de tirosina en cada dilución de los estándares.

Tabla 37. Preparación de la curva de calibración de tirosina

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

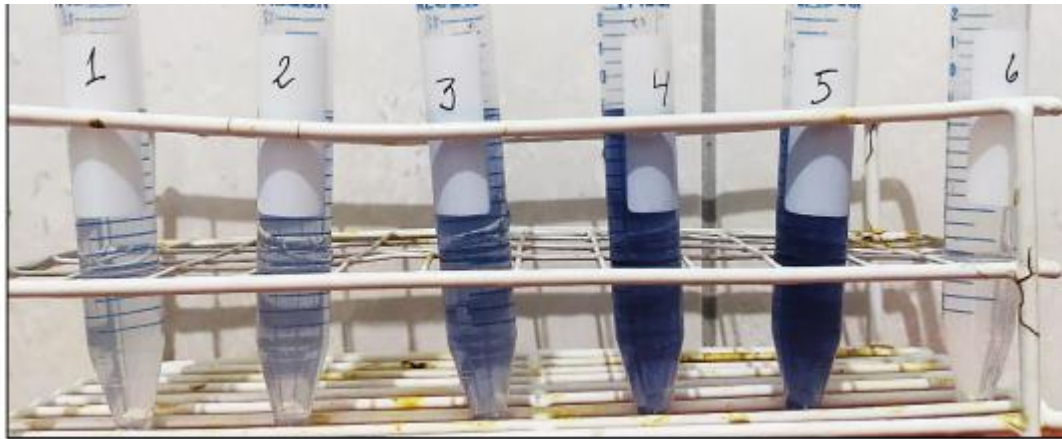


Figura 17. Preparación de la curva de calibración

#### iv. Cálculo de la actividad enzimática

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

$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{ml} \right) = \frac{A \times B}{C \times D \times E} \quad [\text{Eq. 11}]$$

Donde:

A= Concentración de tirosina en la muestra ( $\mu\text{M}$ ).

B= Volumen total del ensayo (ml).

C= Tiempo de reacción enzimática (min).

D= Volumen de proteasa utilizada (ml).

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

v. Curva de calibración

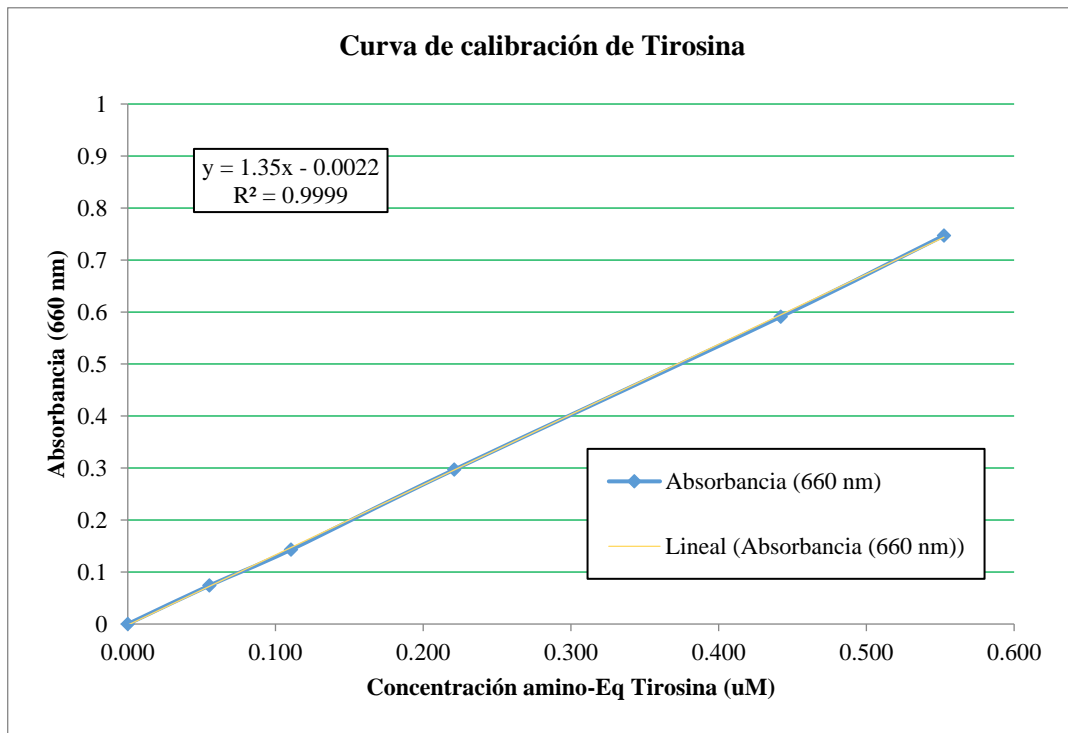


Figura 18. Curva de calibración de Tirosina.

Fuente: Elaboración propia

## ANEXO N° 4 Metodología para determinar grado de hidrolisis.

Método Ortoftaldehído (OPA) para determinación del Grado de Hidrólisis (Nielsen et al., 2001; Guo Et Al., 2019).

### i. Preparación de reactivos

- 7.62 g di-tetraborato sódico  $10H_2O$  y 200 mg SDS en 150 ml de agua destilada.
- 160 mg o-ftalaldehído OPA 99% en 4 ml etanol y adicionar a la solución anterior.
- Añadir a la mezcla 176 mg DTT 99% y aforar hasta 200 ml
- Estándar de serina: Disolver 50 mg en 500 ml de agua destilada para una solución 0.9516 meqv/L

### ii. Análisis de muestras de hidrolizado

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

### iii. Cálculo del grado de hidrolisis

Calculo en función de la fórmula:

$$GH(\%) = \frac{H}{htotal} \quad [\text{Eq. 12}]$$

Donde:



$h$  : Número de enlaces rotos (meqv/g).

$h_{total}$  : Número de enlaces peptídicos (meqv/g). 8.6 para pescado.

$$h = \left( \frac{Serina\ NH2 - \beta}{\alpha} \right) \quad [Eq. 13]$$

Donde:

$\alpha$  : 1.0. Constante para proteína de pescado.

$\beta$  : 0.4. Constante para concentrado de pescado.

$$Serina\ NH2 = \left( \frac{D_{Om} - D_{Ob}}{D_{Oest} - D_{Ob}} \right) * 0.9516 * \frac{D}{p} \quad [Eq. 14]$$

Donde:

$SerinaNH2$  : meqv serinaNH2/g proteína.

$D_{Om}$  : Absorbancia de la muestra (nm).

$D_{Oest}$  : Absorbancia del estándar serina (nm).

$D_{Ob}$  : Absorbancia del blanco (nm).

0.9516 : meqv serina/L.

$D$  : Factor de dilución de la muestra.

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

## **ANEXO N° 5 Metodología para estimar pérdida por cocción**

### **a) Primero: Determinación de Tiempo de cocción**

1. Determine el tiempo de cocción de cada producto añadiendo una de las porciones de 25 g a un vaso de precipitados que contiene 300 ml de agua destilada hirviendo.
2. Inicie el conteo del cronómetro. Revuelva la muestra para asegurarse de que las piezas estén separadas.
3. La ebullición se detiene cuando se agrega el grano similar. Después de que el agua de cocción haya regresado, mantenga esta condición durante toda la prueba. Cubra parcialmente el vaso para ayudar a reducir la evaporación y a mantener una temperatura constante.
4. Usar vaso extra de agua hirviendo para mantener el volumen de agua de cocción al menos al 90% del original volumen, hasta que el producto este cocido y se establece el tiempo de cocción.

### **b) Pérdida por cocción**

Luego de estimar un tiempo de cocción fijo, se procede a:

1. Pesar un vaso de precipitados de 500 ml a 0,01 g.
2. Transferir cuantitativamente el agua de cocción/enjuague al vaso de precipitados.
3. Evaporar hasta sequedad (peso constante) en estufa de aire a  $100 \pm 1^\circ$ . Tiempo de secado es de aproximadamente 20 horas
4. Enfriar los vasos en un desecador y pesarlos hasta 0,01 g. Para una muestra de 25 g, aumento en peso multiplicado por 4 equivale al porcentaje de pérdida por cocción

## ANEXO N° 6 Flujo del proceso productivo del grano símil de arroz.

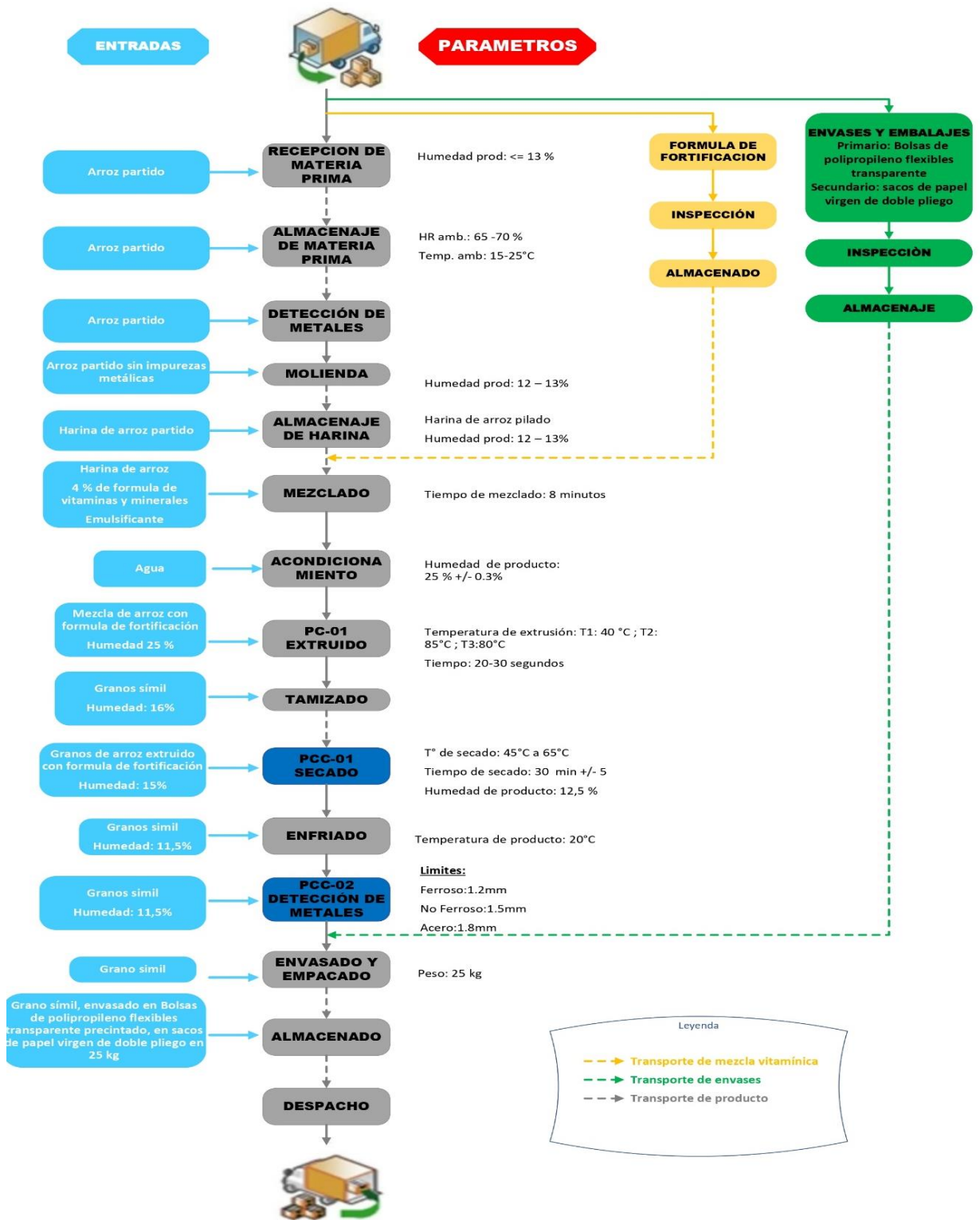


Figura 19. Flujo del proceso productivo del grano símil de arroz implementado por Industrias Proalimentos S.A.C.





**BUREAU  
VERITAS**

LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL  
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON  
REGISTRO N° LE - 031



## INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL N° AG-237850

Pag. 1 / 2

Organismo acreditado : INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C  
Registro de Acreditación : N° LE - 031  
Cliente : COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.  
Dirección : CAL.21 NRO. 713 DPTO. 404 LIMA - LIMA - SAN ISIDRO  
Productor (b) : COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.  
Producto : M1 - CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE)  
Número de Muestras : 1 muestras x 500 g aprox.  
Presentación : Bolsa de polietileno  
Procedencia de la muestra : Inspeccionada y muestreada por el Organismo de Inspección autorizado al SANIPES: Inspectorate Services Perú S.A.C. (a)  
Referencias proporcionadas por el Organismo de Inspección (b) : Tamaño de Lote:  
- M1 - 0,017 TM  
Precinto : LO : METALES PESADOS: 0652040  
Fecha de recepción de las muestras : 13/04/2023  
Fecha de inicio de análisis : 14/04/2023  
Fecha de término de análisis : 15/04/2023  
Orden de Trabajo (OT) : 8449-23

Código de Muestras	Arsénico (As) (mg/Kg)	Cadmio (Cd) (mg/Kg)	Mercurio (Hg) (mg/Kg)	Plomo (Pb) (mg/Kg)
N1 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO DE PESCADO	2,85	0,052	<0,01	<0,02
LC	0,01	0,006	0,01	0,02

### Método

Metales por ICP (B, Na, Mg, Al, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Pb) ISP 022 (VALIDADO) 2017 (En base al método AOAC 2015.01 2016). Determinación de trazas de metales por ICP-MS.

(a) Muestreo fuera del alcance de la acreditación NTP-ISO/IEC 17025:2017.

(b) Esta información es proporcionada por el organismo de inspección por lo que el laboratorio no se hace responsable de la misma.

Figura 21. Informe de ensayo N°AG-237850-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-  
Resultados de análisis de metales pesados del Concentrado proteico  
hidrolizado en polvo de anchoveta



**BUREAU  
VERITAS**

LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL  
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON  
REGISTRO N° LE - 031



INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL N° AG-238333

Pag. 1 / 2

Organismo acreditado	:	INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C
Registro de Acreditación	:	N° LE - 031
Cliente	:	COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.
Dirección	:	CAL.21 NRO. 713 DPTO. 404 LIMA - LIMA - SAN ISIDRO
Productor (b)	:	COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.
Producto	:	M1 - CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE)
Número de Muestras	:	Ensayo Microbiológico: 5 muestras x 500 g aprox.
Presentación	:	Bolsa de polietileno
Procedencia de la muestra	:	Inspeccionada y muestreada por el Organismo de Inspección autorizado al SÁNIPES: Inspectorate Services Perú S.A.C. (a)
Referencias proporcionadas por el Organismo de Inspección (b)	:	Tamaño de Lote: - M1 - 0,017 TM Precinto : MB : 0652030
Fecha de recepción de las muestras	:	13/04/2023
Fecha de inicio de análisis	:	13/04/2023
Fecha de término de análisis	:	18/04/2023
Orden de Trabajo (OT)	:	8447-23

Código de Muestras	Enterobacterias (ufc/g)	Levaduras (ufc/g)	Mohos (ufc/g)	Salmonella (25g)
N1 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	< 10 (1)	< 10 (1)	< 10 (1)	No detectado
N2 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	< 10 (1)	< 10 (1)	< 10 (1)	No detectado
N3 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	< 10 (1)	< 10 (1)	< 10 (1)	No detectado
N4 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	< 10 (1)	< 10 (1)	< 10 (1)	No detectado
N5 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE) CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	< 10 (1)	< 10 (1)	< 10 (1)	No detectado

Figura 22. Informe de ensayo N°AG-238333-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas- Resultados de análisis microbiológico de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta



## INFORME DE ENSAYO N° AG-238795

Pag. 1 / 1

Laboratorio : INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C  
Cliente : COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.  
Dirección : CAL.21 NRO. 713 DPTO. 404 LIMA - LIMA - SAN ISIDRO  
Productor (b) : COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.  
Producto : M1 - CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE)  
Número de Muestras : 1 muestras x 500 g aprox.  
Presentación : Bolsa de polietileno  
Procedencia de la muestra : Inspeccionada y muestreada por el Organismo de Inspección autorizado al SANIPES: Inspectorate Services Perú S.A.C. (a)  
Referencias proporcionadas por el Organismo de Inspección (b) : Tamaño de Lote: - M1 - 0,017 TM  
Fecha de recepción de las muestras : 14/04/2023  
Fecha de inicio de análisis : 17/04/2023  
Fecha de término de análisis : 19/04/2023  
Orden de Trabajo (OT) : 8449-23

Código de Muestras	Fluor (mg/Kg)
N1 CONCENTRADO PROTEICO HIDROLIZADO DE ANCHOVETA TIPO A (FOOD GRADE)	4,22
LC	1,45

### Método

Fluor

Método desarrollado por laboratorio subcontratado: AOAC 975.08, 21 st Ed. 2019 2019 Fluorine in Animal Feed

(a) Muestreo fuera del alcance de la acreditación NTP-ISO/IEC 17025:2017.

(b) Esta información es proporcionada por el organismo de inspección por lo que el laboratorio no se hace responsable de la misma.

Figura 23. Informe de ensayo N°AG-238795-Laboratorio de Ensayo Bureau Veritas-  
Resultados de Fluor de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de  
anchoveta



**PLANTA DE PROCESAMIENTO DE  
PROTEINAS DE PESCADO  
HIDROLIZADAS ENZIMÁTICAMENTE**

**Perfil Típico de Aminoácidos**

---

Fenilalanina + Tirosina	3.66 g/100 g
Isoleucina	2.25 g/100 g
Leucina	4.78 g/100 g
Lisina	5.92 g/100 g
Metionina + Cistina	2.11 g/100 g
Treonina	2.59 g/100 g
Triptófano	0.50 g/100 g
Valina	2.95 g/100 g
Alanina	4.72 g/100 g
Arginina	3.76 g/100 g
Glicina	4.29 g/100 g
Histidina	3.50 g/100 g
Ácido aspártico	5.81 g/100 g
Ácido glutámico	9.26 g/100 g
Prolina	2.59 g/100 g
Serina	2.45 g/100 g

Amino acids acid hydrolysis: ISO  
13903:2005; Cistein + Cystine: ISO  
13903:2005; Tryptophan (Total): EU  
152/2009

**Micronutrientes**

---

Sodio	9.136 g/kg
Potasio	11.39 g/kg
Hierro	59.61 mg/kg
Fosforo	5.126 g/kg
Magnesio	948.8 mg/kg
Cromo	2.39 mg/kg
Molibdeno	0.17 mg/kg

Metales por ICP: EPA Method 200.7;  
1994. Inductively Coupled Plasma-  
Atomix Emission Spectrometric  
Method for trace Element Analysis of  
Water and Wastes

**COLPEX INTERNATIONAL SAC**

Calle 21 No. 713, Dpt. 404, Lima, Peru  
Phone/Fax: 511 2260635

Figura 24. Resultados de análisis de perfil de Aminoácidos y micronutrientes de Concentrado proteico hidrolizado en polvo de anchoveta reportados por el Laboratorio de Calidad de Colpex International S.A.C.





## ANEXO N° 9 Metodología para determinar el grado de similitud

La determinación del grado de similitud se realizó utilizando una escala de intervalo de 1 a 9 puntos (Ramírez-Navas, 2012), a los panelistas entrenados se les pidió evaluar el grado de similitud del extruido (grano símil de arroz enriquecido con concentrado proteico hidrolizado de anchoveta) respecto a un patrón definido: grano de arroz pilado (en función de forma, longitud y espesor), empleándose una escala de intervalo que determinó la intensidad de la similitud en un rango de 1 a 9, donde 1 es menor similitud y 9 es el valor que representa mayor similitud. Los análisis se realizaron por triplicado.

Escala de intervalo para asignar el grado de similitud:

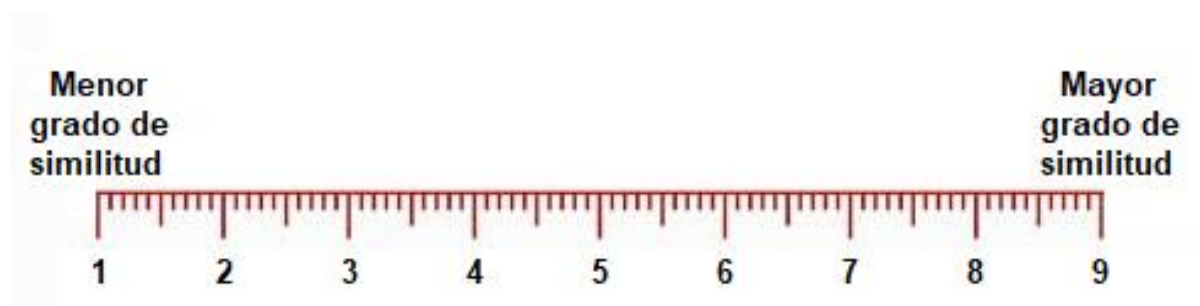


Figura 26. Escala de intervalo para determinar grado de similitud.

Para el desarrollo de esta prueba se contó con la participación de 30 jueces entrenados que evaluaron el grado de similitud de las muestras de extruido (grano símil enriquecido) respecto a la longitud, forma y espesor del grano de arroz pilado de acuerdo al número de tratamiento según codificación.

Los resultados reportados fueron promediados para cada tratamiento y así establecer el grado de similitud del grano símil respecto al grano de arroz pilado.

## ANEXO N° 10 Estudio de vida útil.



### ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

#### INFORME DE ENSAYO N° 001122021

**RAZON SOCIAL** : INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C  
**PRODUCTO** : "GRANO SIMÍL"  
**IDENTIFICACION** : LOTE: GS02102021  
**NUMERO DE MUESTRAS** : 01  
**CANTIDAD DE MUESTRA** : Doce (12) unidades de 350 g. c/u aprox.  
**PRESENTACION** : Envase sellado bolsa de polietileno dentro de una Saco Mixto, un polipropileno laminado con dos pliegos de papel.  
  
**CONDICIÓN DE LA MUESTRA** : Temperatura Ambiente  
**FECHA DE INGRESO** : 19-05-2023  
**FECHA DE INICIO DE ANALISIS** : 21-05-2023  
**ANALISIS REALIZADO EN** : Laboratorio: Microbiología (MB); Físico Química (FQ) y Físico Sensorial (FS)

**CODIGO LABORATORIO**  
**MB:00484**

REQUISITOS	Análisis Microbiológico				UNIDADES	Criterios de Aceptabilidad (RM- N° 451-2006MINSa)
	VALOR OBTENIDO					
	Tiempo 0	1 mes	2 meses	3 Meses		
Recuento de Mohos	50	10x10	29x10	37x10	UFC/g	10 <sup>3</sup>
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	86x10	10x10 <sup>2</sup>	19x10 <sup>2</sup>	27x10 <sup>2</sup>	UFC/g	10 <sup>4</sup>
Recuento de coliformes totales	<10	<10	<10	<10	UFC/g	10 <sup>2</sup>
Recuento de Bacillus cereus	<100	<100	<100	<100	UFC/g	10 <sup>2</sup>
Deteccion de Salmonella	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia o presencia	Ausencia/25g

UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo

REQUISITOS	Análisis Físico químico				UNIDADES	Criterios de Aceptabilidad (RM- N° 451-2006MINSa)
	VALOR OBTENIDO					
	Tiempo 0	1 mes	2 meses	3 meses		
Humedad	13,34	12,55	11,87	10,96	%	15%
Acidez titulable	0.015	0,025	0.943	0,059	%(Exp. Ác. Sulfúrico)	0.15% Exp. Ác. Sulfúrico)

Característica sensorial	Escala de respuestas			Resultados			
	3: Calidad deseable	2: Calidad tolerable	1: Calidad negativa	Tiempo 0	1 mes	2 meses	3 meses
Aspecto	Normal, libre de materias extrañas	Con desviaciones ligeramente perceptibles	Anormal	3	3	3	3
Color	Característico del producto	Con desviaciones ligeramente perceptibles	Anormal	3	3	3	3
Olor	Característico, libre de olores extraños	Con desviaciones ligeramente perceptibles	No característico con presencia de olores extraños	3	3	3	3
Sabor	Característico, libre de sabores extraños	Con desviaciones ligeramente perceptibles	No característico con presencia de sabores extraños	3	3	3	3

## ANEXO N°11 Imágenes del Estudio.



Figura 27. Hidrolizado líquido de anchoveta. Separación de fases mediante centrifugación



Figura 28. Reactores de la planta de COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.





Figura 29. Desarrollo de prueba en las instalaciones de INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC

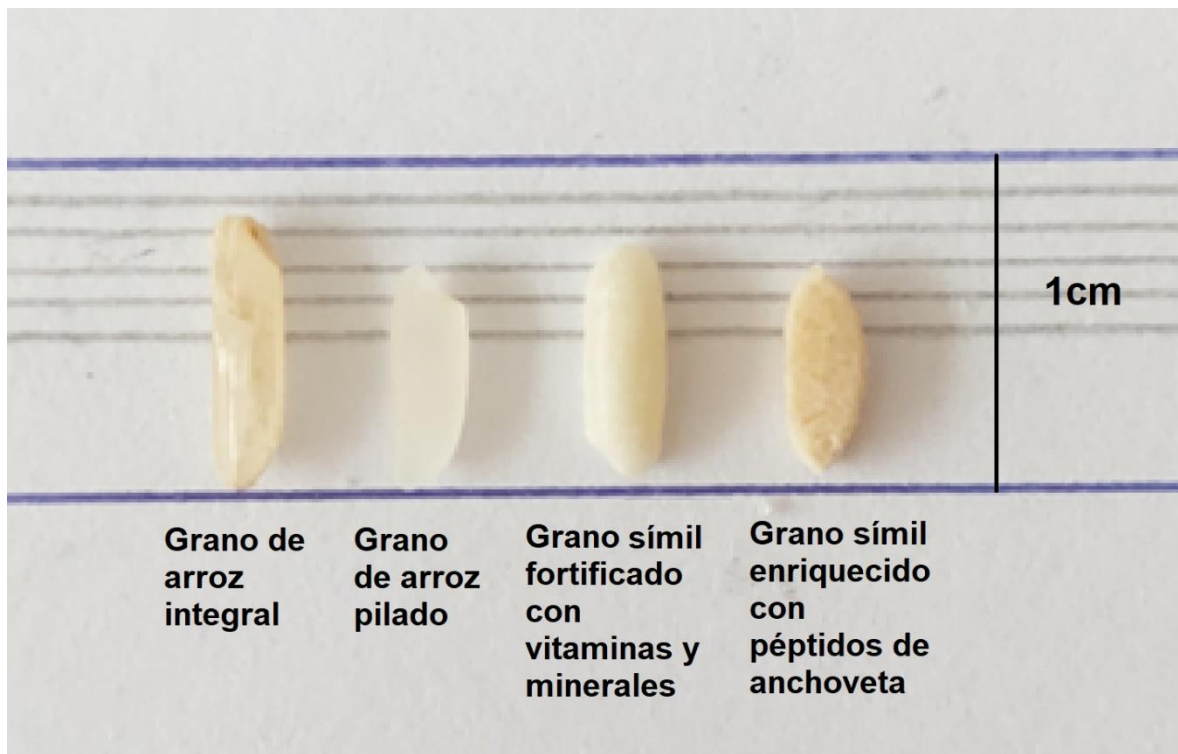


Figura 30. Tamaño y forma de los granos de arroz y grano símil evaluados



**Grano símil fortificado con vitaminas y minerales según RM N° 564-2022-MINSA**



**Grano de arroz pilado  
Variedad NIR**



**Grano símil enriquecido con péptidos de anchoveta**



**Grrano de arroz integral  
Variedad NIR**

**Figura 31. Comparación de forma de grano de pilado e integral respecto al grano símil comercial y el obtenido en presente estudio.**



Figura 32. Prueba de preparación culinaria



## ANEXO N°12 Constancia de uso de instalaciones de Colpex International S.A.C.



### CONSTANCIA

Yo, GABRIEL OMAR SIFUENTES PENADOS identificado con DNI 72559343 en calidad de representante designado por la gerencia de la empresa COLPEX INTERNATIONAL S.A.C. Con RUC 20175140591, Hago constar que el **Mg. Deyvis Jonathan Espinoza Mendoza**, hizo uso de la tecnología y línea de producción implementada en nuestras instalaciones, con el objetivo de realizar su tesis doctoral denominada *“Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anchoveta (*Engraulis ringens*) en las propiedades funcionales de un extruido de arroz (*Oryza sativa*)”*.

Cabe precisar que, de acuerdo, a las coordinaciones previas con el Mg. Deyvis Jonathan Espinoza Mendoza, este se comprometió a mantener la confidencialidad respecto a los parámetros de proceso propios del know how de la empresa COLPEX INTERNATIONAL S.A.C.

En atención al carácter institucional que es menester en estos casos, expido esta constancia a solicitud de parte interesada a los 15 días del mes de octubre del año 2023.



SIFUENTES PENADOS GABRIEL OMAR  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL  
CIP N° 215170

Nombre: GABRIEL OMAR SIFUENTES PENADOS

Cargo: JEFE DE PLANTA DE CONCENTRADO PROTEICO-CHIMBOTE

Celular: 993965882



OFICINA LIMA  
Calle 21 N° 713, Dpto. 404  
San Isidro, Lima 27 - Perú  
Tel/Fax: (51 1) 226-6490 /  
226-0635

Copyright © 2017 Colpex International S.A.C  
Todos los derechos reservados. **Política de Privacidad**








## CONSTANCIA

Yo, EDITH CISNEROS DE LA CRUZ identificado/a con DNI 45729422 en calidad de gerente general de la empresa INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC Con RUC 20609322838, Hago constar que el **Mg. Deyvis Jonathan Espinoza Mendoza**, hizo uso de la tecnología y línea de producción implementada en nuestras instalaciones, con el objetivo de realizar su tesis doctoral denominada "*Efecto de la optimización del hidrolizado enzimático de anchoveta (Engraulis ringens) en las propiedades funcionales de un extruido de arroz (Oryza sativa)*".

Cabe precisar que, de acuerdo, a las coordinaciones previas con el Mg. Deyvis Jonathan Espinoza Mendoza, este se comprometió a mantener la confidencialidad respecto a los parámetros de proceso propios del know how de la empresa INDUSTRIAS PROALIMENTOS SAC.

En atención al carácter institucional que es menester en estos casos, expido esta constancia a solicitud de parte interesada a los 15 días del mes de octubre del año 2023.

INDUSTRIAS PROALIMENTOS S.A.C

  
Edith Cisneros De La Cruz  
GERENTE GENERAL

Nombre: Edith Cisneros De La Cruz

Cargo: Gerente General

Celular:950857922

 956 786 636

 Calle Los Cerezos 291, Lotización Semi - rustica de Chillón / Puente Piedra



ventas@indproalimentos.net.pe  
clientes@indproalimentos.net.pe  
logistico@indproalimentos.net.pe  
calidad@indproalimentos.net.pe



confeperu.com