

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERIA



**“EFECTO DEL VACÍO SOBRE LOS FILETES DE ANCHOVETA
(*Engraulis ringens*) TIPO ANCHOA, ALMACENADOS A
TEMPERATURAS DE REFRIGERACIÓN Y AMBIENTE”**

Presentado por:

ESTRELLITA NAOMI ROJAS DE LOS SANTOS

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO PESQUERO**

Lima - Perú

2018

DEDICATORIA

*A mis padres, mis hermanos y sobrino,
Gracias infinitas por su constante apoyo, guía,
Amor y comprensión en todo momento.*

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios por vivir en mí, por ayudarme a enfrentar todo tipo de obstáculo, por darme todo lo vivido hasta el momento.

A mis padres Edgar y Dina, por estar siempre presente, brindándome su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos y Abelito, por soportarme y comprenderme, por sus palabras y compañía en cada instante de mi vida.

Al Ing. Andrés Molleda Avelino, asesor de la presente tesis, agradecer por su tiempo brindado y orientación en la culminación del presente trabajo.

Agradecer al Mg. Sc. Víctor Miguel Albrecht Ruiz, Co – asesor de la presente investigación, por el afán brindado en la tesis, por su gran paciencia, consejos y apoyo en la redacción del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Jessica Vela Rosas por su apoyo, consejos y amistad brindada durante todo este tiempo y al Ing. Luis Chimpén Salazar por sus consejos y por permitirme ser partícipe de este proyecto.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) por el financiamiento al proyecto “Determinación de Variables Físico-químicas y microbiológicas durante el proceso de maduración”, perteneciente al Área de Curados y Fermentados del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ANCHOVETA (<i>Engraulis ringens</i>)	3
	2.1.1 Distribución.....	4
	2.1.2 Alimentación.....	4
	2.1.3 Edad y crecimiento.....	4
	2.1.4 Reproducción.....	4
	2.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ANCHOVETA	5
	2.2.1 Exportación.....	5
	2.3 ANCHOAS	6
	2.3.1 Etapa de Salazón.....	7
	2.3.2 Etapa de Maduración	7
	2.3.3 Acción de Enzimas.....	8
	2.3.4 Características sensoriales de la anchoa salada – madurada.....	10
	2.3.5 Cambios químicos durante la maduración.....	12
	2.3.6 Inocuidad del producto	13
	2.4 PROCESO DE ELABORACIÓN DE ANCHOVETA (<i>E. ringens</i>)	
	MADURADA TIPO “ANCHOA”	14
	2.4.1 Diagrama de flujo.....	14
	2.4.2 Recepción de materia prima.....	15
	2.4.3 Corte.....	15
	2.4.4 Lavado.....	15
	2.4.5 Desangrado	15
	2.4.6 Salazón.....	15
	2.4.7 Llenado.....	15
	2.4.8 Prensado.....	15
	2.4.9 Madurado.....	16
	2.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	16
	2.6 ENVASADO	17

2.6.1	Envasado en atmósfera controlada.....	17
2.6.2	Envasado en atmósfera modificada	17
a.	Envasado al vacío.....	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	19
3.2	MATERIALES.....	19
3.2.1	Materia prima.....	19
3.2.2	Equipos.....	19
3.2.3	Materiales.....	20
3.2.4	Reactivos.....	20
3.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21
3.3.1	Diagrama de Flujo.....	21
3.3.2	Descripción del proceso.....	23
a.	Recepción de materia prima.....	23
b.	Pesado.....	23
c.	Lavado.....	23
d.	Limpieza y lavado.....	24
e.	Secado (Centrifugado)	24
f.	Fileteado.....	24
g.	Pesado y envasado.....	24
h.	Codificado y almacenado.....	25
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	27
3.5.1	Parámetros de control.....	27
a.	Composición proximal del filete de anchoa.....	27
b.	pH.....	28
c.	Actividad de agua.....	29
d.	Cloruros.....	29
3.5.2	Determinación de variables químicas.....	29
a.	Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV -T)	29
b.	Determinación de Nitrógeno de trimetilamina (N- TMA).....	30
c.	Determinación del Índice de proteólisis (NNP/NT).....	30

d.	Determinación de Grado de hidrolisis (GH)	30
e.	Determinación de Índice de esterificación (IE)	31
f.	Determinación de Ácido tiobarbitúrico	31
3.6	EVALUACIÓN SENSORIAL	32
3.6.1	Preparación de la muestra	32
3.6.2	Área de prueba.....	32
3.6.3	Panelistas	32
3.6.4	Calificación sensorial.....	32
3.7	ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA INOCUIDAD DEL PRODUCTO	33
3.7.1	Recuento de aerobios mesófilos (ufc/g)	33
3.7.2	Mohos (ufc/g) y levaduras (ufc/g).....	33
3.7.3	Nivel de Histamina	33
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	PARÁMETROS DE CONTROL DURANTE EL ALMACENAMIENTO	34
4.2	CAMBIOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS FILETES ENVASADOS AL VACÍO	38
4.2.1	Determinación de IP y GH.....	38
4.2.2	Determinación de IE y TBA	41
4.2.3	Determinación de NBV –T y N-TMA	43
4.3	CALIFICACIÓN SENSORIAL	48
4.4	INOCUIDAD DEL PRODUCTO	51
4.4.1	Análisis microbiológicos	51
4.4.2	Histamina.....	52
V.	CONCLUSIONES	53
VI.	RECOMENDACIONES	54
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
VIII.	ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Tabla para la evaluación sensorial del proceso de maduración de la anchoveta en salazón(anchoa)	11
Cuadro 2: Composición proximal de anchoveta fresca corte HG y filetes de anchoas antes de envasados (Semana 8).....	35
Cuadro 3: Composición proximal de filetes de anchoas envasados al vacío almacenadas a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	36
Cuadro 4: Contenido de Ácido tiobarbitúrico (TBA) mg malonaldehido MDA/kg de los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	42
Cuadro 5. Contenido de microorganismos en los filetes de anchoas envasados al vacío almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5\pm 2^\circ\text{C})$	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anchoveta (<i>Engraulis ringens</i>).....	3
Figura 2: Evolución de exportaciones de anchoas en semiconservas y salazón.....	6
Figura 3: Diagrama de Flujo para elaboración de anchoveta madurada tipo “anchoa”	14
Figura 4: Diagrama de Flujo de Filetes de Anchoveta tipo anchoa.....	22
Figura 5: Diagrama de distribución de las muestra de anchoveta en Proceso de maduración para el estudio y control).	26
Figura 6: Evolución de la actividad de agua (A_w)	37
Figura 7: Evolución del índice de proteólisis (NNP/NT) en los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ Y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	39
Figura 8: Evolución del Grado de hidrolisis en los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	40
Figura 9: Evolución Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	44
Figura 10: Correlación Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en función del tiempo de los filetes de anchoas almacenadas al ambiente.....	45
Figura 11: Correlación Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en función del tiempo de los filetes de anchoas almacenadas en refrigeración.....	45
Figura 12: Evolución del Trimetilamina en los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	47
Figura 13: Evolución del puntaje sensorial los filetes de anchoas envasados almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$	48
Figura 14: Correlación entre la puntuación sensorial e índices de proteólisis (NNP/NT) de los filetes de anchoas almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ envasados al vacío.....	50
Figura 15: Correlación entre la puntuación sensorial y nitrógeno básico volátil total NBV-T de los filetes de anchoas almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ envasados al vacío.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Procedimiento para determinar el grado de hidrolisis	65
Anexo 2: Evaluación sensorial de los filetes de anchoas envasadas al vacío	67
Anexo 3: Procedimiento recuento de aerobios mesófilos (ufc/g).....	68
Anexo 4: Procedimiento mohos (ufc/g) y levaduras (ufc/g).....	70
Anexo 5:Procedimiento para determinar el nivel de histamina.....	72
Anexo 6: Contenido de NaCl , Aw y pH durante el almacenamiento a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C)de los filetes de anchoas envasados al vacío	74
Anexo 7: Correlación entre grado de hidrolisis y el tiempo de almacenamiento correspondientes a los filetes de anchoas envasados al vacío a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C).....	75
Anexo 8: Índice de esterificación (g KOH / 100 g CDW) de los filetes de anchoas envasados almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C).....	76
Anexo 9: Correlación entre el índice de esterificación y el puntaje sensorial correspondientes a los filetes de anchoas envasados al vacío a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C).....	77
Anexo 10: Evolución del puntaje sensorial los filetes de anchoas almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C) envasados al vacío y de la maduración tradicional(muestra control).....	78
Anexo 11: Cara interna de los filetes de anchoas de los lotes correspondientes a la maduración tradicional (a) y de los filetes de anchoas a temperatura ambiente (b) y refrigeración (c) envasados al vacío.....	79

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar la influencia del envasado al vacío sobre los filetes de anchoveta (*Engraulis ringens*) tipo anchoa almacenados en condiciones de refrigeración ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) y ambiente ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 4 meses. Para ello se empleó anchoveta en salazón con un tiempo de maduración de 2 meses, se procedió al fileteo y envasado, almacenados a las temperaturas de 5°C y 20°C , de las cuales se realizaron evaluaciones periódicas cada 15 y 30 días. Las variables fisicoquímicas evaluadas fueron la producción de Bases Volátiles Nitrogenadas Totales (BVN- T), nitrógeno trimetilamina (N-TMA), la relación del Índice de proteólisis, el grado de hidrólisis y los cambios en la fracción lipídica a través del ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e índice de esterificación; además se analizó el comportamiento sensorial comparando con la maduración tradicional de la anchoveta en salazón. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) sobre las cuatro primeras variables mencionadas, no se detectaron diferencias apreciables en la fracción lipídica durante su almacenamiento. Los resultados más resaltantes para las diferentes condiciones de temperatura fueron en los valores de BVN-T que variaron entre 26.91 y 75.74 mg N-BVT/100g; así mismo la relación índice de proteólisis, los valores oscilaron entre 6.10 y 13.20. Con respecto a la evaluación sensorial, se presentaron diferencias en las muestras almacenadas al ambiente, estos se mantuvieron sensorialmente aceptables hasta la semana 18 de muestreo, posteriormente fue rechazada por el panel de cata en la semana 22, calificada como un producto sobremadurado de acuerdo a la tabla sensorial; por otra parte, los filetes en refrigeración presentaron un comportamiento similar a la maduración tradicional, sin embargo no presentó el bouquet característico del producto. Por los resultados, se puede indicar que la condición más favorable es conservar los filetes de anchoas en refrigeración para garantizar la estabilidad del producto.

Palabras clave: *Engraulis ringens*, anchoa, envasado al vacío, salazón, maduración

ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the influence of vacuum packaging on the fillets of anchoveta (*Engraulis ringens*) type anchovies stored under refrigeration and ambient (20°C) conditions for 4 months. For this purpose, was employed salted anchoveta with a ripening time of 2 months, proceeded to the filleting and packaging, stored at temperatures of 8°C and 20°C, periodic evaluations were performed every 15 to 30 days. The physico-chemical variables evaluated were the production of total nitrogen volatile bases (TVB-N) and nitrogen trimethylamine (N-TMA). The ratio of proteolysis index the degree of hydrolysis and changes in the lipid fraction through the test of 2-thiobarbituric acid (TBA) and index of ester. The results showed significant differences ($p < 0.05$) on the first four variables mentioned, there weren't appreciable differences in the lipid fraction during storage. The most outstanding results for the different temperature conditions were TVB-N values ranging from 26.91 and 75.74 TVB-N mg/ 100g; as well as the ratio of proteolysis, values ranged from 6.10 to 13.20. With respect to the sensory evaluation, differences were presented in the samples stored under ambient conditions, these remained sensorially acceptable until week 18 of sampling, was rejected by the panel of tasting in the week 22 qualified as a sobrematurating product according to the sensory table, on the other hand, the filetes in refrigeration presented a behavior similar to the traditional maturation, however not presented the bouquet characteristic of the product. By the results, it can be indicated that the most favorable condition is to preserve the fillets of anchovies in refrigeration to guarantee the stability of the product.

Key words: *Engraulis ringens*, anchovy, vacuum packaging, salting, ripening

I. INTRODUCCIÓN

La maduración de anchoa salada constituye una actividad tradicional en algunos países mediterráneos, principalmente en España, Francia e Italia se elabora a partir del boquerón europeo (*Engraulis encrasicolus*) que es sometido a un proceso de salazón y maduración que demanda entre 3 meses y 1 año. El producto obtenido posee características sensoriales típicas: textura firme y jugosa, color rosado y sabor intenso característico (ajamonado). Debido a la disminución de los stocks de las anchoas en el mar Mediterráneo, al control de su pesca (FAO, 2016) y la posible presencia del parásito anisakis, actualmente otras especies de la familia engraulidae, están siendo utilizadas, entre ellas *E. anchoita* y *E. ringens* en Sudamérica (Czerner, 2011).

La anchoveta (*Engraulis ringens*) representa la biomasa de peces más grande del mundo, se estima un 6% de la captura mundial y es utilizada principalmente para la producción de harina y aceite de pescado para consumo animal (FAO, 2017; Zenteno, 2016). En Perú, el procesamiento de anchoveta para consumo humano está presentando una tendencia creciente, mostrando una producción de salado-madurado de alrededor del 0.7 % en volumen de productos exportados del sector pesquero (PROMPERÚ, 2016), exportándose entre 7 y 11 toneladas anuales de anchoas maduras en sal durante los últimos cinco años (Comtrade, 2017). Se comercializa en diferentes presentaciones, como anchoas en salazón (en barriles), semiconservas (envases de vidrios o metálicos) y filetes salado-madurados envasados en bolsas al vacío (PROMPERÚ, 2015).

La maduración de las anchoas durante la salazón implica un conjunto de complejos procesos químicos y bioquímicos que modifican las características físicas y sensoriales de la carne del pescado. Estas modificaciones son debidas principalmente a la acción de proteasas y lipasas tisulares y digestivas propias del pescado (Steffánson y Guðmundsdóttir 1995; Fernández y Vitancurt, 1999).

Diversos estudios relacionados al proceso de maduración en salazón muestran que algunos ensayos químicos presentan relación con el tiempo de maduración y con los cambios sensoriales.

Al respecto, la comercialización de los filetes salado-madurados envasados al vacío, es una opción cada vez más utilizada por los exportadores de anchoas pues requiere de mínima inversión y permite transportar mayores volúmenes de producto semi-procesado. Su elaboración procede cuando la anchoa en salazón se encuentra en el punto adecuado de maduración y presenta una actividad de agua (A_w) menor a 0.8 y un mínimo de 14% de cloruros, llevándose a cabo la limpieza, el lavado, secado, fileteado y el envasado al vacío en bolsas de polietileno (Resolución de Intendencia Nacional, 2011; INDECOPI, 2013)

La exportación de dichos productos se realiza en condiciones de refrigeración y en periodos relativamente largos que asociados al tiempo de preparación y acopio, resultan en tiempos que suman hasta entre 6 meses. Lamentablemente no se tienen mayores estudios respecto a los cambios físicos, químicos y sensoriales que ocurren en los filetes madurados envasados al vacío durante su almacenamiento, dando paso a reclamos de clientes por la variación de la calidad sensorial de estos productos en su mercado final.

El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios fisicoquímicos y sensoriales en los filetes de anchoas envasados al vacío a fin de conocer si existen diferencias durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración y ambiente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ANCHOVETA (*Engraulis ringens*)

La anchoveta es una especie pelágica de talla pequeña, que puede alcanzar hasta los 20 cm de longitud total. Su cuerpo es alargado 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 (Figura 1). Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16° y 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno. (IMARPE, 2007).



Figura 1: Anchoveta (*Engraulis ringens*)

Según IMARPE- ITP (1996) la denominación de la anchoveta es la siguiente:

Reino	:	Animalia
Filo	:	Chordata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Clupeiformes
Familia	:	<i>Engraulidae</i>
Nombre científico	:	<i>Engraulis ringens</i> Jenyns(1842)
Nombre común	:	Anchoveta, Peladilla (juveniles)
Nombre en inglés	:	Peruvian anchovy
Nombre FAO	:	Anchoveta Peruana

2.1.1 Distribución

En el litoral Peruano se diferencian dos stocks o unidades poblacionales de anchoveta (*Engraulis ringens*) al Norte – Centro desde Zorritos (04°30'S) hasta los 16°00'S en el Perú, la que se comparte con el Norte Chile (16° 01' -24 ° 00'S). (Jordán ,1971)

2.1.2 Alimentación

La anchoveta es plantófaga por excelencia es decir, se alimenta exclusivamente de plancton (fitoplancton y zooplancton) . En términos de abundancia (número de individuos), se alimenta principalmente de fitoplancton, sin embargo, el mayor aporte nutricional (contenido de carbono) lo obtiene del zooplancton, especialmente de eufásidos y copépodos. (Jordán y Vildoso, 1965).

2.1.3 Edad y crecimiento

La anchoveta es una especie de crecimiento rápido, su ingreso a la pesquería se da a una talla entre 8 a 9 cm de longitud total (5 a 6 meses de edad), principalmente entre diciembre y abril, siendo los grupos de edad de uno y dos años los que constituyen mayormente las capturas. (IMARPE, 2007)

2.1.4 Reproducción

Es una especie desovadora parcial, por lo que en cualquier periodo del año es posible encontrar ejemplares en diferentes estados de madurez sexual. Desova en todas las latitudes del mar peruano y las áreas más importantes están frente a Chicama (7°30'S) hasta Chimbote (9°S) y del Callao (12°S) hasta Pisco (14°S). El desove abarca casi todo el año, con dos periodos de mayor intensidad, el principal en invierno (agosto - setiembre) y otro en el verano (febrero - marzo). (Bouchon, *et al.*, 2010).

2.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ANCHOVETA

El desembarque de anchoveta en el 2016 fue de 2.7 millones de toneladas para consumo humano indirecto (CHI) y 54.3 miles de toneladas para consumo humano directo (CHD), de los cuales 15.2 miles de toneladas fue destinado para el área de procesamiento de curados. (PROMPERÚ, 2016).

2.2.1 Exportación

A nivel del mercado mundial la exportación de ingredientes marinos lidera el ranking en el Anuario Estadístico de la IFFO 2015. Perú es responsable por aproximadamente el 25-30% de la producción mundial de harina y aceite de pescado (SNP, 2017).

Las cantidades exportadas a nivel nacional de la harina y aceite de pescado lideran con un 70.4 % las exportaciones y para los productos pesqueros y acuícolas (CHD) como congelados, conservas, curados, diversos y fresco-refrigerados representaron un 29.6% total exportada por el sector. (PROMPERÚ, 2016)

En cuanto a los productos de consumo humano directo, la exportación de anchoas se encuentra disponible en el mercado en diversas presentaciones como anchoas en salazón (en barriles) y como semiconservas (envases de vidrios o metálicos) o como filetes salado-madurados envasados en bolsas al vacío, alcanzó en el año 2016 el valor de US\$ 38.9 millones representando el 0.7 % de las exportaciones totales, alcanzando un volumen de exportación de 7 toneladas (Figura 2) , registrando una caída en el volumen de exportación a causa del fenómeno del niño registrado entre los años 2015 y 2016.(Comtrade, 2017)

El principal producto pesquero curado que se exporta son las anchoas en salazón a base de anchoveta, alcanzando una participación de 60 por ciento en el 2016. (PROMPERÚ, 2016)

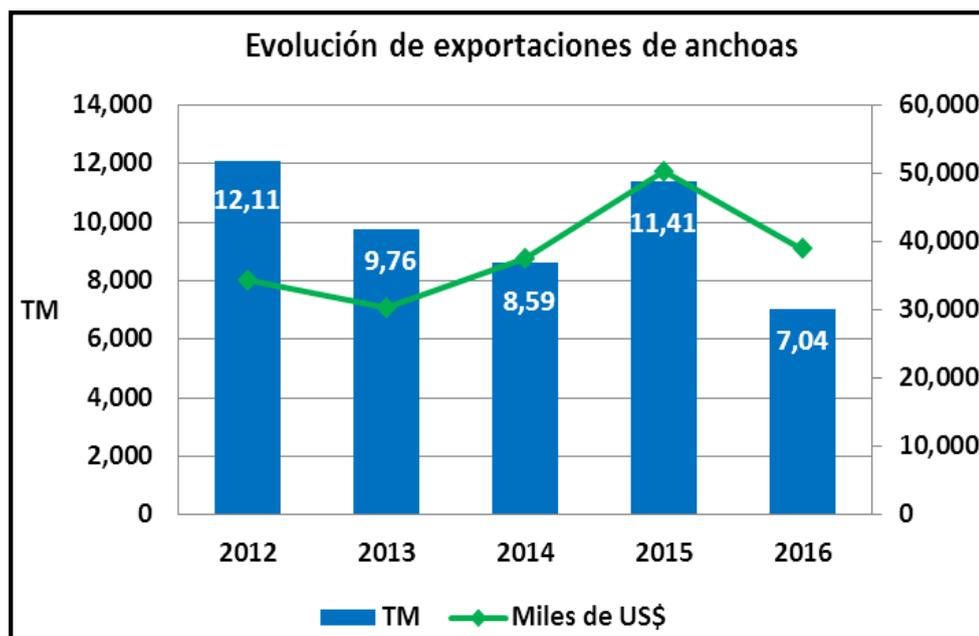


Figura 2: Evolución de exportaciones de anchoas en semiconservas y salazón

FUENTE. Comtrade (2017)

2.3 ANCHOAS

Producto europeo elaborado tradicionalmente por el boquerón. Se entiende por "anchoa en salazón" la denominada *Engraulis encrasicolus* desprovista de cabeza y vísceras, debidamente sazonada en sal común, prensada y madurada (BOE, 1964).

El boletín Oficial de Cantabria (BOC, 2014) define anchoas al producto obtenido a partir del pescado de la especie *Engraulis spp*, después de ser sometida al proceso clásico de salado, prensado y madurado en un medio fuertemente salado, que confiere al producto final unas características organolépticas específicas.

El principio de esta tecnología consiste en un proceso de mezclado, donde hay un aumento en la presión osmótica del medio haciendo uso de la sal y mantiene el sistema en condiciones anaeróbicas, en consecuencia, hay una reducción de la actividad de agua dificultando el desarrollo microbiano y garantizando su estabilidad comercial (Oetterer, 2005; Fuselli *et al.*, 1994).

La velocidad de maduración de los pescados salados depende de la composición original del pescado fresco, de la composición de sal empleada, de la temperatura, de la composición de la salmuera y de la cantidad de sal en los tejidos de los peces (Voskresensky ,1965)

Este proceso consta de dos etapas: la etapa de penetración de la sal hasta la saturación y la etapa de maduración más larga y más lenta que la primera, que da un producto con consistencia tierna, aroma agradable y sabor característicos (Cosnard *et al.*, 1983).

2.3.1 Etapa de Salazón

La salazón es un método de conservación basado en la penetración de la sal en los tejidos y gobernado por diversos factores físicos y químicos tales como la difusión, la ósmosis y una serie de complejos procesos químicos y bioquímicos asociados con cambios en diversos constituyentes (principalmente proteína) del pescado (Voskresensky,1965). La sal es uno de los componentes más importantes ya que determina el sabor y logra producir cambios químicos durante la maduración (Sikorski, citado por Riscabo, 2007).

La penetración de la sal se logra a las 48 horas, y concluye al alcanzarse el equilibrio entre la concentración de sal de la salmuera y la concentración de sal en músculo del pescado, alcanzando un equilibrio isotónico (Zugarramundi *et al.*, 1980), y sin embargo la tasa de penetración de sal varía con el espesor del músculo, la temperatura, la frescura y del contenido de grasa en el pescado (Clucas, 1982).

2.3.2 Etapa de Maduración

En determinadas condiciones con la presencia de sal, la carne de ciertos pescados grasos, puede sufrir modificaciones bioquímicas, presentándose un estado especial llamado “maduración” (Gutiérrez *et al.*, 2005)

Tradicionalmente las enzimas de pescado se han considerado como agentes causantes del proceso de maduración, principalmente enzimas proteolíticas del tracto digestivo (Establier y Gutiérrez, 1972) es un proceso bioquímico que provoca un cambio en las características físico-químicas de los tejidos de peces (Voskresensky ,1965). El tejido adquiere consistencia tierna, desarrollando al mismo tiempo un agradable aroma y un gusto peculiar como resultado del proceso enzimático (Bertullo, 1975, citado por Gutiérrez *et al.*, 2005).

Este proceso requiere varios meses para que la maduración sea completa (Oetterer, 2008) y se caracteriza por la transformación de sustancias orgánicas en compuestos simples por la acción de enzimas, los cambios irreversibles se producen en las proteínas, lo que cambia de manera significativa las características del producto final (Alves, 2012).

Cosnard *et al.*, (1983) menciona que son escasos los estudios llevados a cabo acerca de lo que realmente ocurre en la etapa de maduración a lo largo del proceso, consideran que la maduración es un fenómeno causado sólo por las enzimas propias del pescado, sin intervención del fenómeno bacteriano y que parte de la microflora resistente; así como algunas enzimas naturales dan lugar al proceso fermentativo de este tipo de productos Mattos *et al.*, (1976).

Hay tres hipótesis sobre los mecanismos de maduración del pescado salado madurado. En primer lugar, la teoría microbiológica, manifiesta que el proceso también se puede dar por la participación microbiana (Durand , 1981) aunque otros autores están de acuerdo en que los microorganismos del pescado no participan en el proceso, y en caso que exista alteraciones bacteriológicas serán debido a la contaminación inicial del pescado en el momento de eviscerarlo o por lo escaso del cloruro de sodio (Pirati, 1974 , citado por De la Torre y Soler, 1984); por otra parte los defensores de la teoría autolítica indican que es un resultado de la actividad de las enzimas de los músculos u otros tejidos o del tracto gastrointestinal atribuyen a las enzimas del tracto digestivo el papel exclusivo como agentes de maduración en el pescado (Voskresensky ,1965).

Por último la teoría enzimática resultado de una combinación de la acción microbiana y de la actividad enzimática endógena (enzimas musculares y digestivas) (Voskresensky, 1965; Hernández-Herrero *et al.*, 1999).

2.3.3 Acción de Enzimas

Se encuentra ampliamente aceptado que la maduración de las especies pelágicas ocurre por vía enzimática (Czerner, 2011), aunque no está claro de dónde provienen las enzimas, o qué enzimas son importantes para la maduración (Steffánson y Guðmundsdóttir, 1995). Las enzimas digestivas (tripsina y quimiotripsina) son las que cumplen una función más destacada, con un pH óptimo de 6 a 8 y una mayor acción en concentraciones de sal más elevadas. Las enzimas del tejido muscular también pueden ser importantes (Vorskensky

1965); aunque se ha demostrado que algunas enzimas musculares, por ejemplo, catepsinas, pueden perder actividad a concentraciones de sal relativamente bajas y casi carecen de acción a concentraciones de sal superiores a 15% (Fernández y Vitancurt, 1999).

Desde 1939 se admite que la catepsina interviene en la proteólisis (Baldrati, citado por De la Torre y Soler, 1984), la explicación de que la maduración resulta de enzimas como las catepsinas en los músculos de los peces puede no ser bastante satisfactoria (Zaitsev *et al.*, 1969). Sin embargo, las enzimas musculares no pueden descartarse, ya que algunos estudios indican que el arenque eviscerado madura aunque sea más lentamente que un arenque viscerado.

Estudios realizados por Hernández-Herrero *et al.*, (1999) en *E. encrasicolus*, se observó que la evisceración y limpieza rigurosa llevan a una maduración más lenta y que finalmente, el producto no adquiere el flavor característico, así también la industria encargada de trabajar con arenque mencionaron que el pescado eviscerado madura lentamente y no adquiere el sabor y olor característico; esto indica que las enzimas de los órganos internos juegan un papel importante en la maduración. (Steffánson y Guðmundsdóttir, 1995).

Beirão (1976) reportó resultados similares en la preservación de *Sardinella brasiliensis*, quien realizó estudios con peces enteros, peces eviscerados, peces eviscerados con bromelina y peces eviscerados con papaína, de la cual se observaron mejores características sensoriales de color, sabor y aroma en los peces enteros, así mismo Sánchez (1977), citado por Oetterer *et al.*, (2003) concluyó que las enzimas del sistema digestivo de la cola roja lambari (*Astyanax fasciatus*), actuaban sobre las proteínas que las descomponían, y que en el pescado eviscerado este hecho no ocurrió, ya que las enzimas no estaban presentes.

Es indispensable la evisceración parcial del pescado, eliminando parte de las enzimas digestivas, a fin de evitar el desarrollo de un sabor amargo durante la maduración (Voskresensky, 1965; Czerner, 2011; Durand, 1981).

Esto hace referir que las vísceras contienen enzimas que participan en la maduración del y se produce en mejores condiciones y más rápidamente, en especies conteniendo la

totalidad o parte de sus vísceras, que en especies totalmente evisceradas músculo (FAO, 2009; Fernández y Vitancurt, 1999; Beirão, 1976). La evisceración de los peces es de importancia crítica en su procesamiento ya que la presencia de vísceras contribuye a la maduración de los peces curados (Oetterer *et al.*, 2003).

2.3.4 Características sensoriales de la anchoa salada – madurada

La evaluación sensorial surge como disciplina para medir la calidad de los alimentos, conocer la opinión y mejorar la aceptación de los productos por parte del consumidor. (Hernández, 2005). Lo más importante para obtener un producto final de alta calidad son las características sensoriales, que producirán color, sabor, sabor y textura específicos. Estas características, intrínsecas a ciertas especies, están relacionadas con los músculos de los peces, visceras, microorganismos y enzimas (Oetterer *et al.*, 2003).

Durante el proceso de maduración ocurren una serie de cambios que afectan a su composición y estructura que influyen decisivamente en las características sensoriales del producto acabado, las transformaciones físico-químicas que se producen, convierten la materia prima en un producto comercial, cuyas propiedades organolépticas y químicas difieren notablemente del producto original. Según Bertullo, citado por Gutiérrez *et al.*, (2005), el tejido adquiere consistencia tierna, desarrollando al mismo tiempo un agradable aroma y un gusto peculiar como resultado del proceso enzimático.

Existen diversas variables que intervienen en el proceso y determinan la obtención de un producto de sabor agradable y textura fina, entre estas destacan el grado de eviscerado del pescado que se asocia a la estación de máxima actividad enzimática, la calidad de la materia prima, la severidad del salado, la temperatura del proceso de madurado, la actividad de la microflora, el tipo de sal (Maza y Gallo, 2006).

Filsinger *et al.*, (1982) han descrito una escala para la evaluación sensorial del proceso de maduración en la anchoita, utilizando la experiencia de los profesionales, fueron capaces de desarrollar una tabla de calificación para evaluar cuando el producto ya está en su maduración óptima, teniendo en cuenta cinco factores, el sabor, el olor, el color, la consistencia del músculo y finalmente la adhesión de la carne a la columna vertebral (**Cuadro 1**), cada factor se evalúa individualmente y se califica de 0 a 8.

Cuadro 1: Tabla para la evaluación sensorial del proceso de maduración de la anchoveta en salazón (anchoa)

PUNTAJE	0	2	4	6	8
ADHERENCIA DE LA CARNE AL ESQUELÓN	Muy adherente. Bastante resistencia de filetes al desprendimiento. Fileteado muy complicado.	Bastante adherente. Regular resistencia de filetes al desprendimiento. Fileteado difícil e incompleto.	Adherente. Resistencia parcial de filetes al desprendimiento. Fileteado regular, restos de músculo en cola.	Poco adherente. Desprendimiento de filetes sencillo. Fileteado adecuado.	No existe adherencia. Filetes se desgarran. Fileteado inadecuado.
COLOR DEL MÚSCULO CARNE (evaluar el lado interno de filetes)	Color natural. Rosado translúcido a los bordes. Rojo translúcido en la línea central.	Beige claro a los bordes. Ligeramente rojiza en la línea central.	Distribución no uniforme. Beige claro a los bordes. Marrón y/o rojo oscuro en la línea central.	Distribución uniforme. Beige a los bordes. Rojo oscuro en la línea central.	Distribución no uniforme. Coloración café oscuro, marrón verdoso.
OLOR	Pescado neutro y/o fresco.	Pescado salado. Olor de salmuera. Aroma no intenso.	Ligero a carne curada. Aroma suave.	Característico y agradable de las anchoas maduradas. Aroma suave, agradable.	Rancio, ácido, amoniacal y olores sulfurados. Aroma intenso.
CONSISTENCIA DE LA CARNE	Característico de pescado fresco. Alta elasticidad. Músculo húmedo y firme.	Ligeramente elástico. Músculo regularmente húmedo y firme.	Poca elasticidad. Músculo ligeramente húmedo y firme.	No elástico. Músculo ligeramente húmedo y resistente.	Elástico. Músculo húmedo. Flácido, endeble y blando.
SABOR (SUPERPUESTO A LA SAL)	Pescado crudo.	Pescado seco salado fuerte.	Ligeramente característico a carne curada (ajamonada).	Característico a carne curada-madurada (jamón).	Rancio, desagradable.

El promedio de los cinco parámetros se considera como la puntuación final. El puntaje 8 corresponde a la anchoa deteriorada o sobremadurada y 0 al producto fresco antes de la maduración. El punto de maduración (que corresponde al producto que tiene las características organolépticas óptimas corresponde a la puntuación 6.

El producto obtenido posee características sensoriales típicas, la anchoíta debe presentar un color rosado uniforme; sabor ajamonado; aroma agradable, a ésteres volátiles, característico; consistencia firme y resistente al tacto, no elástica y baja adherencia de la carne al espinazo.

2.3.5 Cambios químicos durante la maduración

Diversos estudios relacionados al proceso de maduración en salazón muestran que algunos ensayos químicos presentan relación con el tiempo de maduración y con los cambios sensoriales. Pirazzoli *et al.*, (2016) indicó que hay una intensa descomposición proteica, además de una liberación de péptidos y aminoácidos libres, que da lugar a la proteólisis.

Para medir este parámetro emplearon el índice de proteólisis que fue propuesto por Mattos *et al.*, (1976) como un indicador de la maduración, fue calculado como la relación entre el Nitrógeno no Proteico y el Nitrógeno Total y ha sido utilizado para evaluar principalmente el grado de maduración en *E. encrasicolus* (Durand, 1981; Pérez-Villareal y Pozo, 1992; Hernández-Herrero *et al.*, 1999; Besteiro *et al.*, 2000; Pons-Sánchez-Cascado *et al.*, 2005). Esta relación también se empleó en la anchoita, indicando que su comportamiento es lineal respecto al tiempo (Czerner, 2011).

Durante la maduración también hay modificaciones en la fracción lipídica, atravesando una serie de alteraciones hasta llegar a la oxidación (Campello, 1985). En la anchoita se observó un incremento en el índice de ésteres a través del tiempo (Filsinger *et al.*, 1982), estos ésteres se forman por reacción de esterificación entre alcoholes y ácidos grasos libres resultantes de la descomposición de los lípidos (FAO, 2009); por otra parte Hernández-Herrero *et al.*, (1999) detectaron que durante la maduración existe un desarrollo de la oxidación lipídica, observándose un aumento en el número de ácido tiobarbitúrico.

El contenido de las bases volátiles es otro parámetro estudiado durante este proceso, Hernández-Herrero *et al.*, (1999) y Czerner (2011) reportaron que existe una alta correlación entre TVBN del músculo del pescado y el tiempo, Filsinger *et al.*, (1984) propusieron el contenido de BVN como indicador para evaluar el deterioro de los boquerones en maduración.

La fracción TVB-N incluye la medición de trimetilamina, dimetilamina, amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros. (FAO, 1986), en relación al contenido de nitrógeno trimetilamina, Czerner (2011) indica que la formación de este sería uno de los factores que originan el aumento del NBVT, además, Czerner y Yeannes (2014) indicaron que en la anchoita la reacción de bacterias halófilas reducen el TMAO contribuye al aumento de TVB-N.

2.3.6 Inocuidad del producto

Los parámetros de pH, A_w y contenido de NaCl, son los que crean condiciones que permiten una protección ante posibles desarrollos microbianos durante las primeras etapas de maduración, lo cual garantiza su estabilidad comercial (Ababouch y Marrakchi, 2009), sin embargo, Huss y Valdimarson, (1990) citado por Czerner (2011), mencionan que es posible encontrar bacterias, mohos y levaduras halófilas que son contaminantes naturales de la sal.

Czerner y Yeannes (2014) indicaron que la anchoa salada (*E. anchoita*) estuvo dominado por bacterias halófilas y por bacterias halófilas extremas al final del proceso, sugiriendo que tendrían una influencia positiva en el desarrollo de las características sensoriales deseadas, sin embargo un alto contenido de halófilas contribuye a la reducción de OTMA, a su vez el aumento del contenido de BVN- T, siendo estos indicadores de calidad que podrían afectar el producto final.

El desarrollo de histamina por descarboxilación bacteriana del aminoácido histidina en el músculo del pescado, es considerado también un indicador de calidad del producto. (Huss, 1997) Sin embargo pueden estar presentes en productos madurados sin estar indicando deterioro (Czerner, 2011).

De acuerdo a la Norma Técnica Peruana 204.056.2013 (INDECOPI, 2013) las especificaciones de calidad que deben cumplir las anchoas en salazón y envasadas para su respectiva comercialización, puede presentar un máximo de 1×10^5 Recuento de aerobios mesófilos (ufc/g); un máximo de 1×10^4 de recuento de anaerobios sulfito reductor, menos de 1×10^2 en Levaduras (ufc/g) y Mohos (ufc/g) y contenido de histamina menor a 50 ppm, para garantizar la inocuidad del producto. Sin embargo, el Diario Oficial de la Unión Europea (2005) indica que los productos sometidos a maduración en salmuera pueden presentar un límite de histamina entre 200 ppm y un máximo de 400 pm.

2.4 PROCESO DE ELABORACIÓN DE ANCHOVETA (*E. ringens*) MADURADA TIPO “ANCHOA”

2.4.1 Diagrama de flujo

El diagrama de flujo seguido para la elaboración de anchoas en salazón es empleado en general por diversas empresas se muestra en la Figura 3

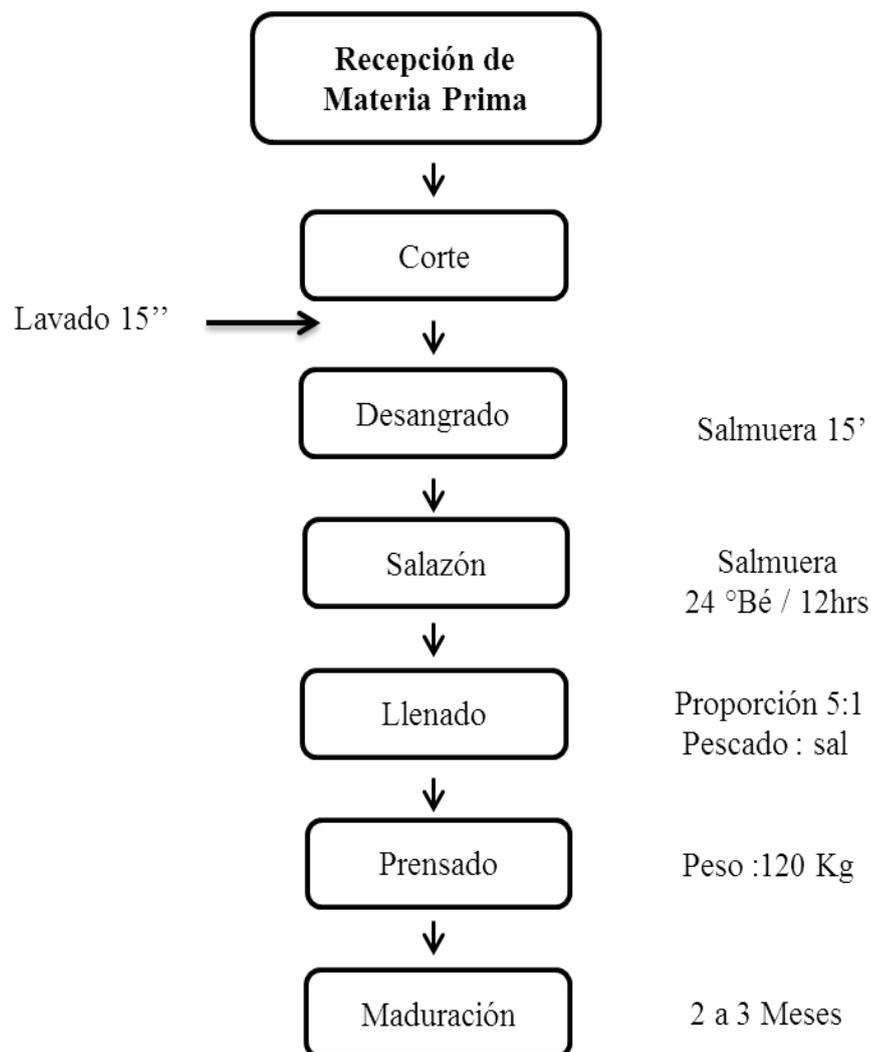


Figura 3: Diagrama de Flujo para elaboración de anchoveta madurada tipo “anchoa”

2.4.2 Recepción de Materia Prima

Se realiza la inspección respectiva de la calidad el cual tiene que cumplir los criterios de calidad de anchoveta fresca (SANIPES, 2010), se reciben en jabas con una mezcla de cremolada de agua y hielo en escamas, almacenadas en cámara de refrigeración para evitar su deterioro y retirados de acuerdo al avance del proceso

2.4.3 Corte

El pescado es descabezado en forma manual, con un eviscerado parcial, siendo conservados también las gónadas y ciego pilóricos

2.4.4 Lavado

Luego del corte, la anchoveta se somete a un lavado con agua, se sumerge en canastillas y siendo sacudidos por 15 segundos.

2.4.5 Desangrado

La anchoveta se deposita en un dynos de 700 litros de capacidad, con salmuera al 5 por ciento entre 10 y 15 minutos. A través de esta operación se remueven los pigmentos sanguíneos pro-oxidantes y también mejora la textura.

2.4.6 Salazón

Se realiza en barriles de 700 litros de capacidad con salmuera de 24°Bé (sal molida refinada – gruesa sin yodo) durante 12 horas.

2.4.7 Llenado

La mezcla se coloca ordenadamente y de manera compacta en barriles de 250 Kg, se ordena alternadamente capas de pescado y sal en una proporción de 5:1.

2.4.8 Prensado

Se coloca una plataforma de plástico circular quien soporta un peso de 120 Kg, este ejerce presión en el producto. Una vez alcanzado el borde del recipiente, se agrega salmuera saturada para desplazar el aire atrapado en el interior del contenedor, esto evita la oxidación del producto.

2.4.9 Madurado

Durante el proceso se produce transformaciones fisicoquímicas y enzimáticas, obteniéndose así el producto con las características sensoriales deseadas. Se hace seguimiento del madurado y se agrega solución salina saturada en caso de ser necesario, para evitar la actividad de microorganismos patógenos. La maduración consta de un tiempo de 3 a 6 meses según las empresas que elaboran este producto.

2.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La temperatura juega un papel muy importante en el procesado y almacenamiento de los alimentos, ya que pueden regular las modificaciones químicas, enzimáticas y microbianas. En condiciones de refrigeración o congelación, las modificaciones no deseadas se hacen más lentas o se interrumpen, el calentamiento por una parte acelera las reacciones químicas o enzimáticas no deseadas y por otra evita las alteraciones no deseadas por inactivación de las enzimas o por muerte de los microorganismos (Belitz *et al.*, 2012).

La temperatura influye en los procesos enzimáticos durante la maduración. Las modificaciones bioquímicas deben ser lentas y graduales para un mejor control a fin de obtener características organolépticas óptimas, una temperatura entre 18 a 20 ° C es la más adecuada y permite, en general obtener un producto conocido como "Anchoa" en tres meses, una temperatura baja entre 12 a 15 °C conduce a una maduración adecuada, pero en estas condiciones la duración es prolongada (FAO, 2009). Una temperatura elevada acelera las reacciones bioquímicas, puede provocar la llamada "sobremaduración" en particular de proteólisis y da como resultado un producto alterado observándose defectos en los cambios sensoriales (Pirazzoli *et al.*, 2016).

La refrigeración consiste en conservar los alimentos a baja temperatura, superior a 0° C y menor a 10°C, a estas temperaturas no se produce el desarrollo de microorganismos, sin embargo empiezan a multiplicarse cuando empieza a calentarse el alimento (Narvaez, 2007).

Las condiciones de refrigeración no detienen los cambios sensoriales, ni el crecimiento bacteriano, ni su actividad enzimática, pero si ralentizan dichos procesos y da como consecuencia la aparición de los productos de degradación relacionados con el deterioro. (Pons-Sánchez-Cascado *et al.*, 2005).

La temperatura óptima para acelerar el proceso de maduración puede ser entre 28 y 30°C, sin embargo la maduración tradicional se da a temperatura ambiente (Sola, 1998). Para la especie *Engraulis encrausicholus*, el proceso de maduración óptima oscila entre los 18 ° C y los 25 ° C, cuanto mayor sea la temperatura o menor el prensado, más rápido madurarán las anchoas (Yeannes y Casales, 1995). A bajas temperatura (12-15 °C) da como resultado la maduración adecuada pero en estas condiciones se prolonga el proceso de maduración (FAO, 2009).

2.6. ENVASADO

2.6.1 Envasado en atmósfera controlada

Es una técnica frigorífica de conservación que modifica la composición gaseosa de la atmósfera en la que sustituye el aire por un gas o una mezcla de gases específicos cuya proporción se fija de acuerdo a las necesidades del producto, en la que se realiza un control de regulación de las variables físicas del ambiente (temperatura, humedad y circulación del aire). Las atmósferas controladas se usan en almacenes de frutas y verduras enteras y en el transporte en contenedores de alimentos perecederos por carretera o mar. (**García *et al.*, 2006, Orjuela *et al.*, 2002**)

2.6.2 Envasado en atmósfera modificada

El envasado en atmósfera modificada (MAP en sus siglas inglesas, modified atmosphere packaging) implica la eliminación del aire del interior del envase y su sustitución por un gas o mezcla de gases, generalmente CO₂, O₂ y N₂, en materiales con barrera a la difusión de los gases. Esta modificación en el ambiente gaseoso disminuye el grado de respiración, reduce el crecimiento microbiano y retrasa el deterioro enzimático con el propósito de alargar la vida útil del producto. (Ospina y Cartagena, 2008)

a. Envasado al vacío

Es una técnica que modifica la atmosfera del medio al reducir la cantidad de oxígeno presente, sin que sea reemplazado por otro gas, existiendo una diferencia de presión entre el exterior y el interior del envase (Parry, 1995; Brody, 1996). Al haber menos oxígeno disponible disminuye la posibilidad de la reproducción de la microflora, retardando la acción de bacterias y hongos que necesitan este elemento para sobrevivir (Salas, 2008).

Brody (1996) señala, que los alimentos metabólicamente activos envasados al vacío, continúan con sus actividades respiratorias, consumiéndose así la pequeña cantidad de oxígeno presente en los tejidos del producto, con lo que aumenta el vacío y se produce dióxido de carbono y vapor de agua.

Limita el crecimiento bacteriano pudiendo desarrollar solamente las bacterias anaerobias, evita la oxidación y disminuye o anula la deshidratación del producto, si el envasado al vacío se agrega la acción de las bajas temperaturas reduce sustancialmente la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas con lo que en conjunto se obtiene un incremento en la vida útil del producto (Rodríguez, 2003).

El envasado es fundamental para la preservación de alimentos durante toda su vida útil, es este quien garantizará que todo el esfuerzo dedicado en el procesamiento de un alimento de calidad va a ser respetado y mantenido durante el transporte, distribución, comercialización, llegando el alimento a la mesa del consumidor, adecuado para el consumo, siendo especificada correctamente para cada tipo de producto alimentos y procesamiento. Debe proteger el producto alimenticio de factores como el oxígeno, la luz, la humedad, la absorción de olores extraños, la pérdida de valor nutricional y el aroma y la contaminación microbiológica, entre otros, permitiendo que alcance la vida útil deseada (Padula e Ito, 2006).

En la maduración de anchoas, los procesos proteolíticos continúan en las etapas post-salazón, incluso durante el almacenamiento de los filetes envasados de forma diferente y su control, obtenido mediante el mantenimiento de una temperatura de almacenamiento adecuada, desempeña un papel crucial en la vida útil del producto (Sebastio *et al.*, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), la parte experimental se llevó a cabo en el Área de Curados y Fermentados del Cite Pesquero y en los laboratorios se realizaron los análisis físico – químicos y sensorial.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materia prima

La Anchoqueta (*Engraulis ringens*) en salazón proveniente de la empresa APPECCA S.R.L de Chimbote, se almacenó a temperatura ambiente hasta que se realizó el proceso de envasado de filetes al vacío.

3.2.2 Equipos

- Balanza analítica, marca Ohaus, precisión 0,001 g.
- Bomba de aspiración (neutralizador) , marca Gerhardt
- Agitador de Tubos, marca
- Centrifuga modelo Centra CL – 2 , marca Thermo
- Cocinilla eléctrica, marca Barnstead
- Congeladora, marca Friolux
- Selladora al vacío, marca Multivac
- Potenciometro, marca Mettler Toledo
- Digestor (Kjeldahl), marca Gerhardt
- Destilador arrastre de vapor (Kjeldahl), marca Gerhardt
- Estufa, marca Binder

- Espectrofotómetro UV/VIS, marca Perkin Elmer
- Molino de cuchillas, modelo GM 200, marca Retsch
- Homogeneizador, marca Nissei
- Baño termostático (60°C y 90°C) , marca Memmert
- Extractor de grasas, marca Gerhardt
- Mufla modelo F48020-8, marca Barnstead Thermolyne
- Termómetro digital, marca
- Medidor de actividad de Agua modelo Pre, marca Decagon Devices
- Sistema de agua ultrapura, marca Barnstead

3.2.3 Materiales

- Bolsas de poliamida con polietileno de 90 micras
- Embudos de vidrio, marca Pyrex
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250mL, marca Pyrex
- Fiolas de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL, marca Schott Duran
- Beackers de 100, 250, 500 mL, marca Pyrex
- Pipetas volumétricas de 10, 25 y 50 mL, marca Brand
- Probetas de 50,100, 250 y 1000 mL, marca Pyrex
- Micropipetas de 200, 1000, 2500 y 10000ul, marca Isolab
- Crisoles de porcelana, marca Haldenwanger
- Pesafiltros , marca Witeg
- Tubos de ensayo 15 ml , marca Pyrex
- Gradillas de acero inoxidable
- Tablas para picar , recipientes de plástico
- Tubos de centrifuga de 50 mL, marca Brand

3.2.4 Reactivos

- Ácido clorhídrico p.a. 37 % de pureza, marca Merck
- Ácido sulfúrico p.a. 95 - 97 % de pureza, marca Fermont
- Ácido bórico
- Ácido tiobarbitúrico
- Ácido tricloroacético

- Carbonato de potasio
- Dinitrofluorobenceno
- Formaldehido
- Hexano
- Hidróxido de potasio
- Hidróxido de sodio p.a. 97,0 - 98,5 % de pureza, marca Fisher Scientific
- Buffer pH 4, pH 7 y pH 10,1, marca Merck
- Ácido perclórico p.a. 70,0 % de pureza, marca Mallinckrodt
- Indicador azul de bromofenol, marca Merck
- Etanol absoluto p.a. 99,8 % de pureza, marca Merck
- Nitrato de plata

3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La elaboración de anchoas en el Perú se realiza de forma artesanal en la mayoría de las empresas.

3.3.1 Diagrama de flujo

En el proceso de elaboración de los filetes de anchoveta tipo anchoa envasado al vacío se utilizó anchovetas pre saladas de la empresa A.P.PESCA S.R.L, como se muestra en la Figura 4.

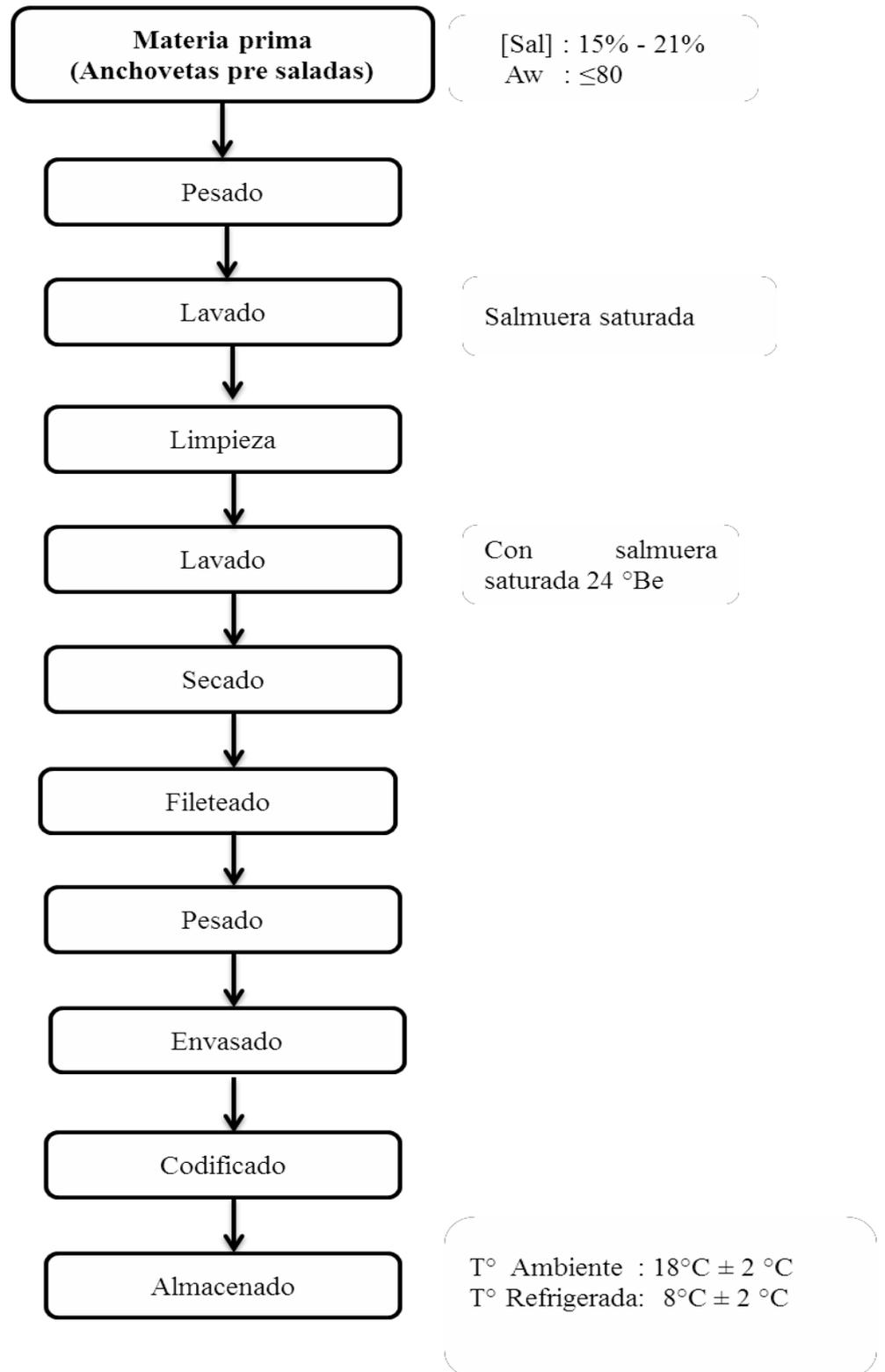


Figura 4: Diagrama de Flujo de Filetes de Anchoveta tipo anchoa

3.3.2 Descripción del proceso:

Preparación de filetes de anchoveta tipo anchoa envasadas al vacío

a. Recepción de materia prima

La anchoveta mantenida en salazón (2 meses de maduración) se destinó como materia prima para la elaboración de filetes de anchoas.

Los barriles con anchoveta pre salada fueron trasladados al área de fileteo de la planta de Curados, se realizó una evaluación físico – organoléptico para verificar el grado de maduración que presentaba la anchoveta.

Se registró la cantidad de anchoveta pre salado que se empleó para las pruebas experimentales.

La anchoveta en salazón utilizada como materia prima para la elaboración de filetes de anchoveta tipo anchoa tuvo las siguientes características:

- Concentración de Sal : 15% - 21%
- Actividad de Agua (AW) : no mayor que 0,80
- Histaminas : no mayor que 100 ppm

b. Pesado

Esta operación consistió en extraer el pescado del barril y depositarlo en bandejas plásticas donde inmediatamente se precedió al pesaje.

c. Lavado

Al momento de ser extraídas en bandejas plásticas, fue sometido a un lavado en forma previa a realizar la limpieza. Este lavado se realizó sumergiendo las bandejas con anchoas en una tina con abundante agua en salmuera saturada y se agitó de forma manual para eliminar la sal y soltar las escamas, esto permitió facilitar la operación de la limpieza.

d. Limpieza y lavado

Esta operación consistió en eliminar los restos de vísceras y gónadas, así como la eliminación de los restos de escamas y piel de la anchoa en salazón, luego se procedió a lavar el producto con salmuera saturada.

e. Secado (Centrifugado)

De acuerdo al flujo seguido por la empresa A.P.Pesca S.R.L emplearon centrifugas para eliminar el exceso del agua; en la planta de curados del ITP se realizó de forma manual a presión con paños absorbentes. Las anchoas en salazón provenientes del lavado fue depositada sobre las mesas en forma ordenada sobre los paños, se ejerció presión manual para eliminar el exceso de líquido, fueron depositados en bandejas plásticas, y se efectuó el fileteo.

f. Fileteado

El producto secado fue colocado en una mesa, donde se llevó a cabo el fileteado y moldeado. Esta operación se realizó de la siguiente manera: primero fue eliminado el espinazo, luego se repasó con una tijera eliminando restos de piel, cola, espinas que sobresalen del abdomen y escamas en caso de ser necesario, se separaron las porciones musculares longitudinales de la columna vertebral para obtener dos filetes de cada pescado. Los filetes se colocaron sobre bandejas para su posterior pesaje y envasado.

g. Pesado y envasado

En una mesa se colocó las balanzas electrónicas, y se procedió al pesaje de las bandejas con los filetes, se pesaron alrededor de 250 a 400 gr de filetes, una vez pesado se precedió a la etapa de envasado y sellado.

El sellado de las bolsas se llevó a cabo en una máquina para producir vacío. Esta máquina cuenta con una cámara en la cual fue colocada la bolsa y en forma automática realizó el vacío y posterior sellado hermético de las bolsas.

Una vez que la bolsa se encuentra sellada se retira de la cámara de vacío, eventualmente se revisa como queda el sellado y se procede a su codificación.

h. Codificado y Almacenado

Las bolsas fueron rotuladas de acuerdo al tipo de tratamiento (Temperatura Ambiente – Temperatura Refrigerada). Una cantidad se almacenó en un equipo de temperatura controlada ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$), y la otra cantidad en un refrigerador ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$). La muestra en salazón continuó el proceso de maduración en los barriles a temperatura ambiente.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue completamente al azar, con dos tratamientos a diferentes condiciones de temperatura a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ sobre las seis variables fisicoquímicas: Nitrógeno básico volátil total (mg N-BVT/100g), Nitrógeno trimetilamina (mg N-TMA/100g), Grado de hidrolisis, índice de proteólisis, índice de esterificación y del análisis Ácido tiobarbitúrico (mg TBA/g). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y en aquellos en los que se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) se realizó la prueba de Tukey. Los resultados experimentales se procesaron en el programa Statgraphics 17.

De igual manera se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para el análisis sensorial de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas con la maduración tradicional.

Para la realización del experimento se prepararon alrededor de 100 bolsas de nylon-polietileno de 20 x 30 cm con un grosor de 90 μm conteniendo entre 300 y 400gr de filetes de anchoa. Para la preparación de la muestra se extrajo alrededor de 80 kg anchoveta en salazón con una actividad de Agua menor a 0.80 según la Norma Técnica Peruana 20456 (INDECOPI, 2013) teniendo una maduración aproximada de 2 meses. Se procedió de acuerdo al esquema experimental mostrado en la Figura 5.

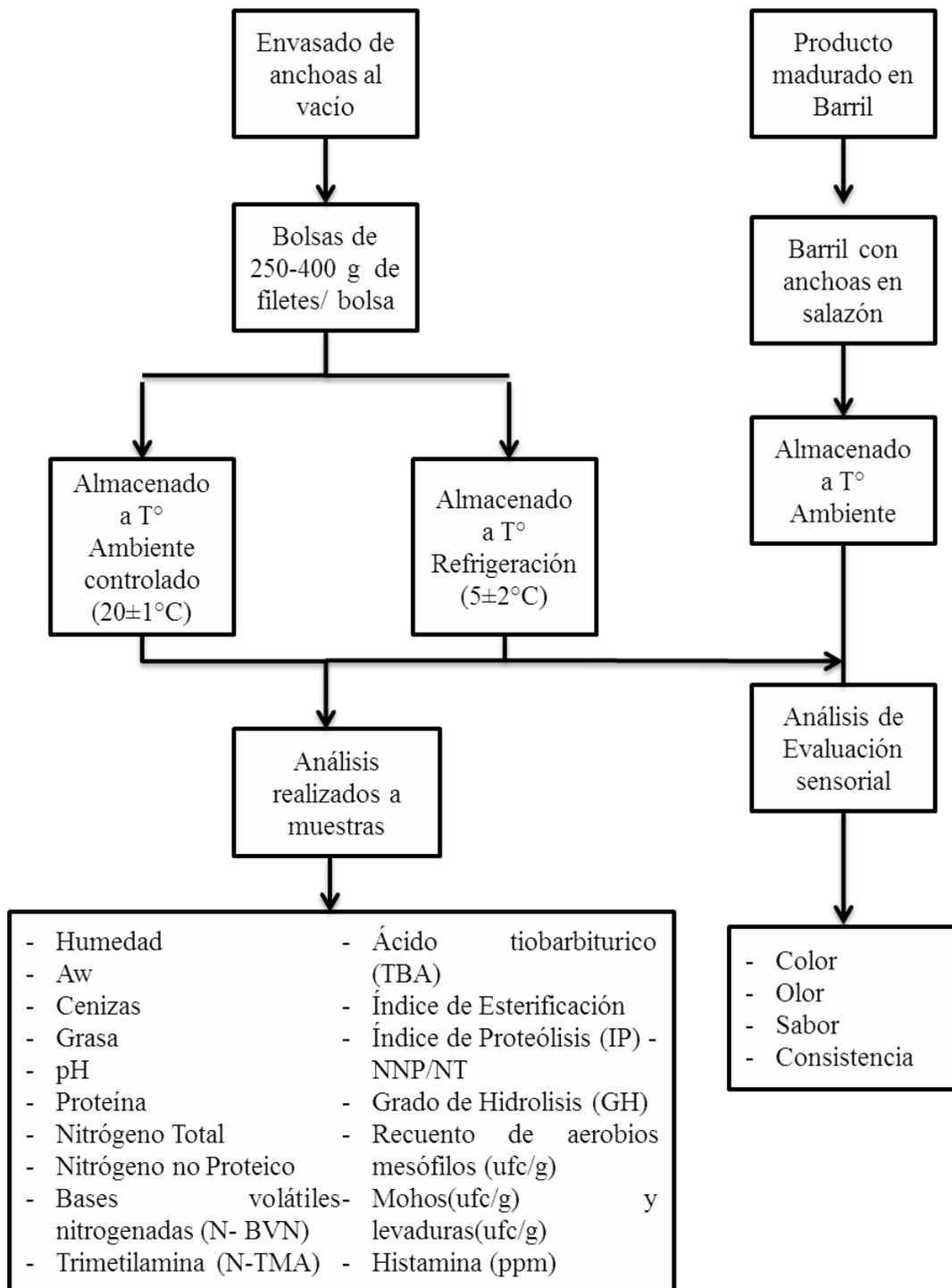


Figura 5: Diagrama de distribución de las muestra de anchoveta en proceso de maduración para el estudio y control.

- Se envasaron bolsas al vacío y fueron almacenados a temperatura de ambiente controlado a $(20 \pm 1^\circ \text{C})$
- Se envasaron bolsas al vacío y fueron almacenados a temperatura de refrigeración entre $(5 \pm 2^\circ \text{C})$
- La muestra control continuó su proceso de maduración a temperatura ambiente

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Parámetros de control

a. Composición proximal del filete de anchoa

- **Humedad**

La determinación de la humedad (FAO, 1986) del producto se realizó pesando 2 g de muestra en pesafiltros previamente pesados, se llevó a la estufa a 105°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró de la estufa y se dejó enfriar. Posteriormente se procedió a registrar el peso. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

- **Grasa cruda**

El contenido de grasa se determinó por el método de Soxhlet (FAO, 1986) utilizando como solvente orgánico hexano. Se pesaron 2 g de muestra en balones soxleth, se añadió 20 ml de Ácido Clorhídrico 6 N y se conectó al refrigerante dimroth por 30 minutos. Se filtró en un matraz con papel filtro whatman Nro 1, se conservó el papel y se colocó en una estufa a 100°C por 24 horas. La muestra deshidratada en el papel filtro se introdujo en cartuchos de celulosa, tapados con algodón en vasos de vidrio previamente pesados, estos fueron introducidos en el equipo Soxtherm (marca Gerdarth) durante un tiempo de 5 horas. Una vez culminado el proceso se extrajó los vasos, y se retiraron los cartuchos con la muestra desgrasada, finalmente se llevó a la estufa hasta la eliminación del disolvente. Una vez enfriados, se pesaron los vasos con el contenido de grasa.

- **Nitrógeno Total / Proteína**

Se determinó el contenido de nitrógeno utilizando el método Kjeldahl (FAO, 1986), empleándose el factor de conversión 6.25 para la determinación de proteína.

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de muestra en un papel libre de nitrógeno y se introdujo en un tubo Kjeldahl con ácido sulfúrico concentrado (15 ml) y catalizador (sulfato de cobre y de sulfato de sodio). Las muestras fueron digeridas durante un tiempo de 3 horas hasta alcanzar una temperatura de 400°C en un digestor (Kjeldahl).

El extracto obtenido, se dejó enfriar y se vació en una fiola de 100 ml hasta enraizar con agua desionizada. Se tomó 25 ml del destilado de la fiola y se colocó en un tubo kjeldahl .En un Erlenmeyer se recogió 5 ml de ácido bórico más 5 gotas de tashiro, ambos recipientes (Tubo y Erlenmeyer) fueron colocados en el destilador Vapodest por un tiempo de 5 minutos, luego se extrajo el Erlenmeyer con el destilado del equipo. La cantidad de amoniaco formado se valoró con HCl 0.02 N hasta que el color se tornó a verde claro, se anotó el gasto, y la cantidad de proteína se obtuvo multiplicando el valor de nitrógeno total por 6.25.

- **Ceniza**

La determinación de cenizas se realizó por medio de calcinación en una mufla a 600°C de marca Barnstead (FAO, 1986).

Se pesó entre 3 a 5 g de filetes triturados en crisoles previamente pesados, se precalcino la muestra en una cocinilla eléctrica evitando que se inflame, luego se introdujo en una mufla a temperatura de 600 °C durante 12 horas. Una vez finalizado el proceso, se realizó el pesado de los crisoles en una balanza analítica, obteniendo el peso final.

b. pH

Para la determinación del pH se utilizó un potenciómetro marca Metler Toledo. Previamente se realizó la calibración del electrodo de pH empleando las soluciones tampón de pH 7,0 pH 4,0 y pH 10,02, para garantizar medidas precisas. Se pesó 1 g de muestra y se adicionaron 100 ml de agua destilada, homogeneizar. La muestra se dejó reposar 5 minutos y a continuación se realizó la lectura con el electrodo esperando la estabilización de la medida. El equipo dio la lectura directa del valor del pH.

c. Actividad de Agua(Aw)

La actividad de agua (Aw) se determinó con el equipo Aqualab modelo CX -2 (Decagon), se fundamenta en la técnica del punto de rocío, una pequeña fracción de muestra fue introducida en cápsulas de plástico. Dentro de la cámara circula aire y cuando alcanza el equilibrio el sensor registra el valor de Aw.

d. Cloruros

El contenido de cloruros se determinó con el Método de Mohr (Nielsen, 2010). Se pesaron entre 0,3 y 0,5 g de muestra en un vaso metálico, se adicionó 100 ml de agua desionizada, homogeneizar y dejar reposar durante 30 minutos. Se filtró el contenido en un matraz de 100 ml, posteriormente se tomó 25 ml de la muestra filtrada, se transvasó a un matraz de 100 ml y se añadió 3 gotas de Cromato de potasio saturado, finalmente se tituló con Nitrato de plata saturado (AgNO₃), hasta que el color del contenido se tornó de un color amarillo hasta color rojo ladrillo. Anotar gasto.

3.5.2 Determinación de variables químicas

a. Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV -T)

Se determinó bajo la metodología del Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2008). Se pesaron 10 g de muestra en un vaso metálico, se mezcló con 90 ml de solución de ácido perclórico al 6% luego se homogeneizo durante 2 minutos y se filtró en una fiola de 100 ml. Posteriormente para la destilación, se tomó una alícuota de 25 ml del extracto obtenido se echó en un tubo kjeldahl más 5 gotas de fenolftaleína para comprobar posteriormente que esta alcalinizado, tras añadir gotas de agente antiespumante de silicona se agregó 6.5 ml de NaOH al 20% y se colocó en el destilador Gerdarth . En un matraz se colocó 50 ml de ácido Bórico al 3%, se añadió 3 gotas de la solución indicadora tashiro y se sumergió en el tubo de salida del destilador y se inició inmediatamente la destilación a vapor. Se programó la operación durante 7 minutos, se retiró del tubo de salida el matraz y finalmente se determinó mediante valoración con una solución de ácido clorhídrico 0.05N, el contenido tiene que tornó de un color fuxia a un color violeta, se anotó el gasto. Se realizó una prueba en blanco, en lugar del extracto se utilizó 50 ml de solución de ácido perclórico al 6%.

b. Determinación de Nitrógeno de trimetilamina (N- TMA)

Se determinó bajo la metodología de microdifusión de Conway (Conway, 1935). Se basa en la adición de formaldehído y carbonato de potasio en un extracto desproteínizado volatizando sólo los compuestos nitrogenados procedentes del N - TMA que serán captados por la solución de ácido bórico presentes en el centro de la cámara el cual será valorada con una solución ácida. Se pesaron 10 g de muestra en un vaso metálico, se añadió 50 ml de tricloroacético al 5 %, se homogeneizó por 2 minutos. Se filtró el extracto en una fiola de 50 ml con papel Whatman N°5, se enrazó con agua destilada de ser necesario. Luego impregnar con parafina las placas conway en los bordes de la tapa y base para generar hermeticidad al cerrar. Colocarlas de manera inclinada estable, y colocar en el centro un recipiente de aluminio. En las divisiones de la placa, adicionar en el centro 1 ml de Ácido bórico, en otra división colocar 1 ml de carbonato de potasio, en el otro extremo 1 ml del extracto y adicionar 500 ul de formaldehído al 20%. Cerrar inmediatamente el envase, colocar la placa de forma horizontal y agitar con movimientos rotatorios, para asegurar el recipiente colocar un gancho metálico. Incubar a 37°C por 2 horas y media en la estufa; al culminar valorar con ácido clorhídrico 0.01 N el cambio de color es de un rojo grosella a verde. Para la muestra en blanco, usar tricloroacético al 5% en vez de la muestra.

c. Determinación del Índice de proteólisis (NNP/NT)

El análisis para la determinación de nitrógeno no proteico se realizó mediante el método de Kjeldahl (FAO, 1986). La determinación de índice de proteólisis fue calculado como la relación entre el Nitrógeno No Proteico / Nitrógeno Total.

d. Determinación de Grado de hidrolisis (GH)

El grado de hidrolisis representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces de la proteína. Se determinó bajo el método de Sanger que emplea para el análisis el reactivo dinitrofluorobenceno (DNFB), este es un derivado amarillento del benceno, reacciona con los grupos amino expuestos de la proteína y, en particular, con el grupo amino N-terminal de un extremo de la cadena. Anexo 1.

e. Determinación de Índice de esterificación (IE)

Se determinó bajo la modificación del método de AOAC método No. 9.125, citado por Filsinger *et. all.* (1982). Se pesaron 2 g de muestra en balones soxleth, se añadió 10 ml de Hidróxido de Potasio (KOH), se colocó dentro del envase 4 perlas de vidrio. Luego se colocó el balón en la cocina eléctrica marca Barnstead conectado a un refrigerante durante una hora, culminado el tiempo se añadió 10 gotas de fenolftaleína al 1% y se tituló con ácido clorhídrico 25 N, la muestra tiene que cambiar de color fuxia a color original de la muestra, marrón oscuro.

f. Determinación de Ácido tiobarbitúrico (TBA)

Se determinó mediante una modificación del método de Vyncke (1970). En un vaso metálico se pesó 1 g de muestra en la balanza analítica marca Ohaus, se añadieron 25 ml de tricloroacetico al 5%, se homogeneizó por 2 minutos. Se filtró el homogeneizado a través de una papel filtro Whatman N°5 en un matraz de 250 ml. Se tomó una alícuota del extracto de 2,5 ml, en caso de ser necesario según el contenido en malonaldehído, tomar una alícuota menor y agregar agua destilada hasta completar los 5 ml , tomada la alícuota se llevó a un tubo que tenga tapón de rosca con capacidad de 10 ml, se añadió 2,5 ml de la disolución de TBA (mezclar 1 g de propilen galato más 1 g de EDTA (ácido tiobarbiturico concentrado) más 2,88 g TBA, solubilizarlo completando 1 litro con agua destilada).

Los tubos cerrados fueron introducidos en un baño de agua a 90°C durante 40 minutos. Posteriormente fueron enfriados rápidamente. Se realizó la cuantificación mediante la preparación de una curva estándar a partir de la solución de tetraetoxipropanocon una concentración de 1/20000 a partir del cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 0, 50, 100, 250, 500 uL, enrazando cada tubo con 2,5 ml de agua más 2,5 ml de TBA al igual que el extracto, se incubo en baño termostático a 90°C por 40 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro marca Perkin. Se calculó el índice de TBA como mg malondialdehído/g de muestra.

3.6 EVALUACIÓN SENSORIAL

3.6.1 Preparación de la muestra

Se evaluaron sensorialmente las muestras en salazón tradicional, para ello se extrajeron muestras durante el proceso de maduración, estos fueron fileteados y presentados al panel de cata. De igual manera fueron procesadas las muestras almacenadas a diferentes temperaturas. Las muestras fueron codificadas para su evaluación.

3.6.2 Área de prueba

Los análisis sensoriales se llevaron a cabo en el laboratorio de Sensorial (Sala de catas) de ITP, cuenta con un ambiente controlado y con cabinas de degustación individuales.

3.6.3 Panelistas

Estos análisis cuantitativos descriptivos se llevaron a cabo mediante un panel formado por 8 panelistas entrenados para la evaluación de anchoas, por un tiempo de 4 meses cada 15 a 30 días

3.6.4 Calificación sensorial

En cada prueba, se empleó la tabla sensorial de Filsinger *et. al.* (1982) y Vásquez (1997), para la muestra control y para los filetes de anchoveta tipo anchoa envasadas al vacío se empleó dicha tabla modificada. Los tributos a evaluar fueron: el sabor, color de la carne, olor y consistencia de la carne.

El puntaje de los tributos de cada análisis se efectuó sobre una escala de 0 a 8, para la muestra control (Cuadro1) y de 2 a 8 para filetes de anchoveta tipo anchoa envasadas al vacío (Anexo 2).

3.7 ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA INOCUIDAD DEL PRODUCTO

Las identificaciones microbiológicas y del nivel de histamina se realizaron en la última fecha de muestreo (semana 22), para determinar si es un peligro para la salud del consumidor.

3.7.1 Recuento de aerobios mesófilos (ufc/g)

La Numeración de Microorganismos Aerobios mesófilos viables permite estimar el número total de organismos aerobios en un alimento, se realizó mediante el método convencional de recuento en placa (FDA, 2001a). Ver Anexo 3

3.7.2 Mohos(ufc/g) y levaduras(ufc/g)

La numeración de mohos y levaduras en alimentos se realizó mediante la técnica de dilución en placa (FDA, 2001b). Ver Anexo 4

3.7.3 Nivel de Histamina

La determinación de histamina se realizó bajo el método HPLC con detector ultravioleta, se basa en determinar el contenido de histamina del alimento mediante la extracción en ácido tricloroacético, derivatización mediante cloruro de dansilo, se basó en la Norma Chilena Oficial (2001). Ver Anexo 5

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PARÁMETROS DE CONTROL DURANTE EL ALMACENAMIENTO

En el Cuadro 2 se presenta la composición proximal de la materia prima utilizada (anchoveta corte HG), así mismo se presenta los valores de los filetes obtenidos luego de la salazón (Semana 8), se pueden verificar que los contenidos de humedad, proteína, grasa cruda y ceniza, experimentan variaciones considerables ($p < 0.05$), debido a la deshidratación osmótica por la alta concentración de sal en el medio, al momento de atravesar la etapa de salazón (Eroglu y Yildiz, 2010; Oetterer, 2005; Zugarramundi *et al.*, 1980).

Respecto al contenido de grasa cruda de los filetes de anchoas oscilaron alrededor del 3%, observándose un decremento a comparación del valor inicial (9%), esto se debe en primer lugar al efecto de la presión ejercida en el barril presentando pérdidas de la grasa hacia la salmuera, además de haberse realizado la eliminación de la piel y de la grasa subcutánea para la obtención del filete. De la misma manera al haber pérdida de agua del músculo del pescado, se registró un decremento en la humedad, y de manera consecuente las cenizas y las proteínas se incrementaron (Ver cuadro 2).

Cuadro 2: Composición proximal de anchoveta fresca corte HG y filetes de anchoas antes de envasados (Semana 8)

Componente (%)	Anchoveta fresca corte HG	Filetes de anchoas
Humedad	70.6 ± 0.18	52.05 ± 0.12
Proteína	16.5 ± 0.04	25.48 ± 0.56
Grasa cruda	9 ± 0.57	3.10 ± 0.58
Ceniza	2.3 ± 0.04	16.93 ± 0.45

Durante el periodo de estudio, la composición proximal (Ver Cuadro 3), pH, Aw y contenido de sal en los filetes envasados al vacío, se mantuvieron sin cambios significativos ($p > 0.05$) tanto en las muestras refrigeradas como las de ambiente. Así mismo, se observa que el envasado al vacío no afectó significativamente estos parámetros medidos luego del envasado. ($p > 0,05$). (Ver Anexo 6)

Cuadro 3: Composición proximal de filetes de anchoas envasados al vacío almacenadas a (20 ± 1 °C) y 5 ± 2 °C)

Filetes Envasados al vacío	Semana	g / 100g			
		Ceniza	Grasa	Humedad	Proteína
Refrigeradas (5 ± 2 °C)	9	17.13 ± 0.05	3.52 ± 0.15	51.53 ± 0.19	24.23 ± 0.12
	14	17.55 ± 0.32	2.37 ± 0.19	51.44 ± 0.48	26.01 ± 0.90
	18	17.33 ± 0.46	3.41 ± 0.08	52.09 ± 0.07	25.67 ± 0.41
	22	17.97 ± 0.22	3.36 ± 0.09	52.11 ± 0.07	27.46 ± 0.17
Ambiente (20 ± 1 °C)	9	17.25 ± 0.65	3.47 ± 0.22	51.58 ± 0.22	26.83 ± 0.97
	14	17.30 ± 0.49	2.50 ± 0.14	52.26 ± 0.31	26.86 ± 1.20
	18	17.91 ± 0.16	3.17 ± 0.10	51.24 ± 0.32	26.04 ± 0.12
	22	17.99 ± 0.13	3.29 ± 0.17	51.86 ± 0.40	27.86 ± 0.07

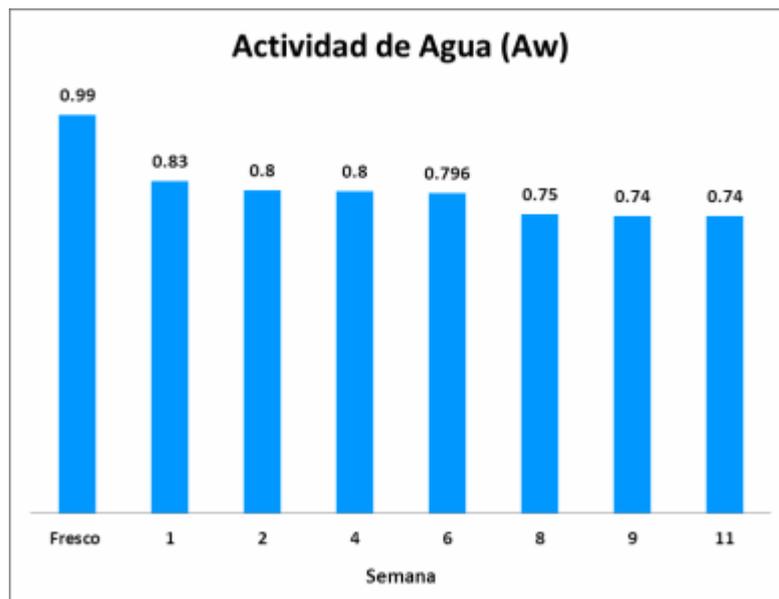


Figura 6: Evolución de la actividad de agua (Aw)

La actividad de agua de los filetes frescos presentó un valor de 0.9, después de la salazón entre la primera y cuarta semana disminuyó a valores de 0.8, este valor presentó una disminución significativa hasta estabilizarse (Ver Figura 6), presentando valores de 0.74 – 0.75 a partir de la semana 8 asegurando la estabilidad comercial del producto ($A_w \leq 0.76$) evitando así el crecimiento de bacterias putrefactivas durante el proceso de maduración (FAO, 2009).

En relación a la evaluación del pH, antes del envasado de los filetes (octava semana), se registró un pH de 5.76. Luego de ser envasados al vacío, este valor osciló entre 5.60 y 5.90 para ambas condiciones de almacenamiento (Ver Anexo 6), obteniendo un valor promedio de 5.73 y 5.75 para las muestras refrigeradas y al ambiente, respectivamente, lo cual concuerda con trabajos realizados por otros autores en la maduración tradicional de la anchoveta (Maza y Salas, 2004), así mismo los resultados obtenidos de cloruro de sodio se mantuvieron constantes presentando ligeras oscilaciones que variaron entre 17% y 20 %, semejante al obtenido por Vásquez (1997) y Maza y Salas (2004) .

Estos parámetros analizados presentaron un perfil físico-químico muy semejante en el tiempo y esto se debe a que el producto se estabiliza durante la salazón. (Czerner, 2011; Vásquez, 1997)

4.2 CAMBIOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS FILETES ENVASADOS AL VACÍO

4.2.1 Determinación de IP y GH

Los resultados referente a la fracción proteica en el musculo de la anchoa muestran que la temperatura influye de manera significativa ($p < 0.05$) sobre el índice de proteólisis (IP) y el grado de hidrolisis (GH) a través del tiempo.

En la octava semana se registró un índice de proteólisis (IP) de 6.10 de las anchoas en salazón, luego de envasados se observa que las muestras almacenadas al ambiente aumenta linealmente hasta obtener un IP de 13.20 en la semana 22 (Ver figura 7), así mismo se presentó un ligero incremento en las muestras refrigeradas hasta registrar una relación de 9.77, presentando una diferencia del 26% respecto al ambiente.

La temperatura juega un papel importante en la aceleración del proceso (FAO, 2009), un incremento de este indica un aumento en NNP/NT y como consecuencia la actividad proteolítica aumenta (Czerner, 2011; Durand, 1981; Hernández-Herrero, 1999a; Besteiro *et al.*, 2000; Pons-Sánchez-Cascado *et al.*, 2005).

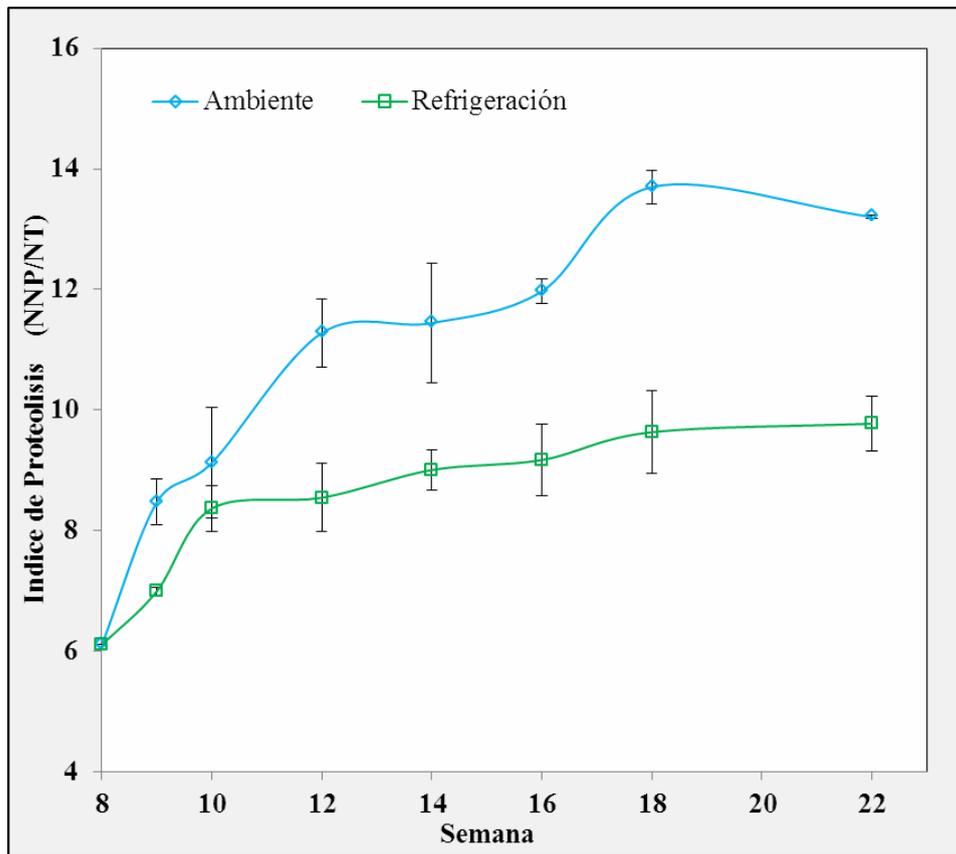


Figura 7: Evolución del índice de proteólisis (NNP/NT) en los filetes de anchoas envasados almacenados a ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) Y ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

En la anchoita argentina (*Engraulis anchoita*) madurada de forma tradicional en el mes 6, se obtuvo un menor índice de proteólisis en muestras almacenadas a menor temperatura (20) que las almacenadas a mayor temperatura (26.2) (Czerner,2011); por otra parte, Maza y Salas (2004) obtuvieron una relación de 14.5 en anchoas (*Engraulis ringens*) maduras en barriles para el día 150, la cual presenta una diferencia frente al valor obtenido en las muestras envasadas al vacío a temperatura ambiente (13.20) , esto se podría explicar de que la ausencia de vísceras influye en la maduración , haciendo el proceso más lento y por consiguiente haya una baja actividad de las enzimas digestivas (Fernández y Vitancurt,1999; Voskresensky, 1965; Steffánson y Guðmundsdóttir, 1995; Hernández-Herrero *et al.*, 1999),sin embargo en otro estudio en anchoas saladas-maduras de *Engraulis ringens* no encontraron aquella relación con el tiempo de maduración (Vásquez, 1997).

El Grado de hidrolisis (GH) presentó en la octava semana un valor inicial de 3.28, ya envasados se observó paulatinamente el incremento de esta medida alcanzando valores máximos de 4.49 y 7.38, para las condiciones de refrigeración y ambiente respectivamente. (Ver figura 8)

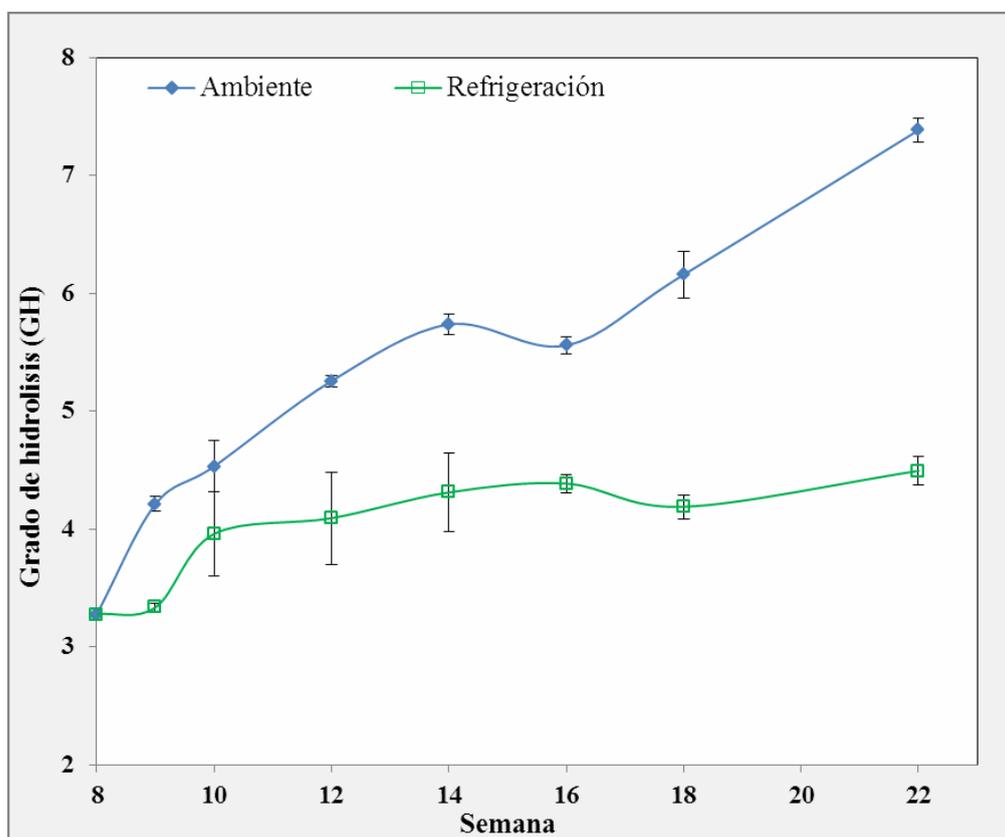


Figura 8: Evolución del Grado de hidrolisis en los filetes de anchoas envasados almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C)

Se observa que las muestras almacenadas al ambiente (20 ± 1 °C) presenta una mayor pendiente en comparación a las que se encuentran refrigeradas (5 ± 2 °C); esta variable nos indica que existe una buena correlación con el tiempo durante el almacenamiento, ($r_{20^{\circ}\text{C}} = 0.988$) y ($r_{5^{\circ}\text{C}} = 0.976$) (Ver Anexo 7), se puede afirmar que la influencia de la temperatura afecta en el grado de hidrolisis, indicando que un aumento en la misma conlleva a un incremento de esta variable. Al estar relacionado con la proteína, al igual que el índice de proteólisis, se estaría indicando que existe actividad proteolítica, por ello es

seguro indicar que a mayor temperatura dan lugar a una mayor velocidad de proteólisis (Czerner, 2011).

4.2.2 Determinación de IE y TBA

En presencia de altos contenidos de oxígeno, la rancidez de los lípidos se acelera en el músculo del pescado (Beirão, 1976). Es inexistente la información sobre los cambios que ocurren en los lípidos durante la maduración de la anchoveta y de los filetes de anchoas (*E. ringens*) al vacío.

El TBA es un indicador ampliamente utilizado para la evaluación del grado de oxidación lipídica (Chouliara *et al.*, 2004), no se presentaron diferencias ($p>0.05$) en el contenido de ácido tiobarbitúrico (TBA) referente a las dos temperaturas de almacenamiento durante el tiempo.

Los valores obtenidos de TBA durante el almacenamiento se muestra en el Cuadro 4, las muestras refrigeradas alcanzaron un máximo de 17.9 mg MDA/Kg en la última semana, por otra parte las muestras al ambiente a partir de la semana 14 se mantuvieron prácticamente constante hasta el final de muestreo.

Cuadro 4. Contenido de Ácido tiobarbitúrico (TBA) mg malonaldehido (MDA)/kg de los filetes de anchoas envasados almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C)

Semana	Acido Tiobarbitúrico (TBA) mg MDA/ Kg	
	20 ± 1 °C	5 ± 2 °C
8	2.6 ± 0.01^a	2.6 ± 0.01^a
9	6.2 ± 0.03^d	$4.8 \pm 0.04^{b,c}$
10	4.5 ± 0.01^b	3.4 ± 0.04^b
12	5.7 ± 0.05^c	$4.4 \pm 0.01^{b,c}$
14	7.6 ± 0.17^g	6.9 ± 0.01^d
16	6.9 ± 0.04^f	$9.1 \pm 0.00^{c,d}$
18	7.7 ± 0.01^h	10.5 ± 0.04^d
22	6.5 ± 0.01^e	$17.9 \pm 0.00^{c,d}$

A pesar de ser un producto envasado al vacío, los alimentos continúan sus actividades metabólicas consumiéndose así las pequeñas cantidades de oxígeno presentes en los tejidos del producto (Brody ,1996); estudios realizados por Rodríguez *et al.*, (2009) en bagre (*Pseudoplatystoma sp.*) concluyeron que es más favorable la disminución de la temperatura que la eliminación del oxígeno del empaque, sin embargo, los filetes envasados al vacío y refrigeradas, presentaron un mayor valor de oxidación.

Se observa en el Cuadro 4 , que las muestras al ambiente oscilan en el contenido de TBA, es así que en la última semana de muestreo presentó un bajo contenido de 6.5 mg MDA/Kg a comparación de las refrigeradas (17.9 mg MDA/Kg); en el ensayo las muestras almacenadas a 20 ± 1 °C, presentó un color amarillo siendo asociado a la presencia de aldehídos saturados provenientes de la oxidación de lípidos (Sun *et al.*, 2001), en vez de presentar la coloración fuxia que indica la presencia de malonaldehido, este resultado podría ser explicado por Damodaran *et al.*, (2010) quienes mencionaron que la técnica presenta limitaciones ya que son poco sensibles a bajas concentraciones de malonaldehido (MAD); además que este reacciona con las proteínas, encontrándose menores niveles a los que corresponden con la oxidación presente en la muestra (Pereira y Tenuta- Filho, 2005).

Respecto al índice de esterificación (IE), no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dos diferentes temperaturas (20 ± 1 °C y 5 ± 2 °C) a través del tiempo de almacenamiento, los valores oscilaron entre 20.24 y 22.79 g de KOH / 100 g de materia seca desalinizada (CDW). (Ver Anexo 8).

Los resultados obtenidos fueron altos a comparación de la anchoa argentina, quien presentó un contenido de 9 g de KOH / 100 g de materia seca desalinizada indicando una buena progresión de la maduración. (Filsinger *et al.*, 1982), esta diferencia de valores podría estar atribuido al tratarse de dos especies diferentes, dado que la anchoveta es considerada como un pescado graso con registro de valores de grasa variable de 3.9% a 11.6 %. (Maza *et al.*, 2016).

Este índice es considerado un parámetro en la maduración tradicional de la anchoa argentina al existir una estrecha correlación con la puntuación sensorial, por otra parte en otro estudio de la misma especie, concluyó que no hubo relación de este parámetro, recalcando que las especies analizadas fueron extraídas en diferentes periodos del año (Filsinger *et al.*, 1982; Filsinger, 1987), esta relación tampoco se vio reflejada en los resultados. (Ver Anexo 9).

4.2.3 Determinación de NBV –T y N-TMA

El contenido de N-BVT en los filetes envasados al vacío presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para ambas condiciones de almacenamiento en el tiempo. El valor inicial antes de ser envasado al vacío (semana 8) fue de 26.91 mg N-BVT/ 100g, se visualiza que en las muestras almacenadas en refrigeración (5 ± 2 °C) los valores de BVN se incrementaron levemente durante su almacenamiento, manteniéndose entre los 26 y 32 mg N-BVT/100 g, así mismo las muestras almacenadas a (20 ± 1 °C) incrementaron progresivamente sus valores hasta alcanzar los 75,7 mg N-BVT/ 100 g en la semana 22. (Ver Figura 9).

En la maduración tradicional en la anchoíta (*E. anchoita*), Hernández-Herrero *et al.*, (1999) reportaron un valor de 35.64 mg N/100 g a la novena semana, así mismo en la semana 22, Czerner (2011) reportó un valor alrededor de 70 mg N/100 g.

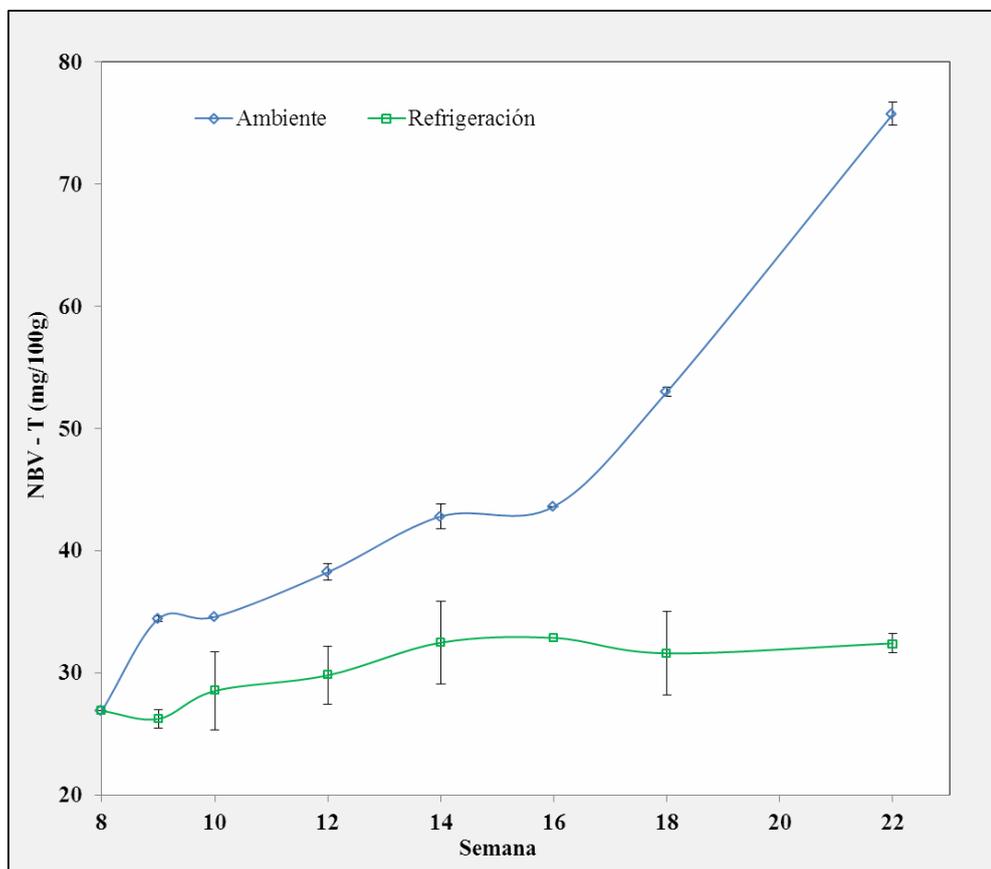


Figura 9: Evolución Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en los filetes de anchoas envasados almacenados a ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) y ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

Las muestras mantenidas en refrigeración ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) se mantienen ligeramente constantes, esto indicaría que el efecto de la temperatura incide sobre los resultados obtenidos en la evolución de las bases volátiles nitrogenadas. Un similar hallazgo fue citado por Czerner (2011) en un estudio durante la maduración tradicional de anchoíta argentina (*Engraulis anchoita*), que a pesar de la ausencia de vísceras en el producto, el aumento de este podría estar relacionado con los sistemas enzimáticos musculares y microbianos, no exactamente digestivos, afirmando que el proceso se desarrolla en virtud de una combinación de factores endógenos y microbianos. (Voskresensky, 1965)

Si bien el NBV-T se produce a partir de la degradación de proteínas y compuestos nitrogenados no proteicos principalmente como resultado de la actividad microbiana (Jeyasanta, *et al.*, 2016), este aumento en el contenido estaría relacionado principalmente a los sistemas enzimáticos musculares, dada por las catepsinas, quienes también desempeñan un papel no despreciable durante la maduración, que darían características diferentes a la maduración de las anchoas, puesto que tradicionalmente mantienen parte de sus vísceras durante la maduración, siendo principalmente las enzimas digestivas, como la

quimiotripsina y la tripsina, las encargadas de desarrollar sus características. (Fernandes, 2016).

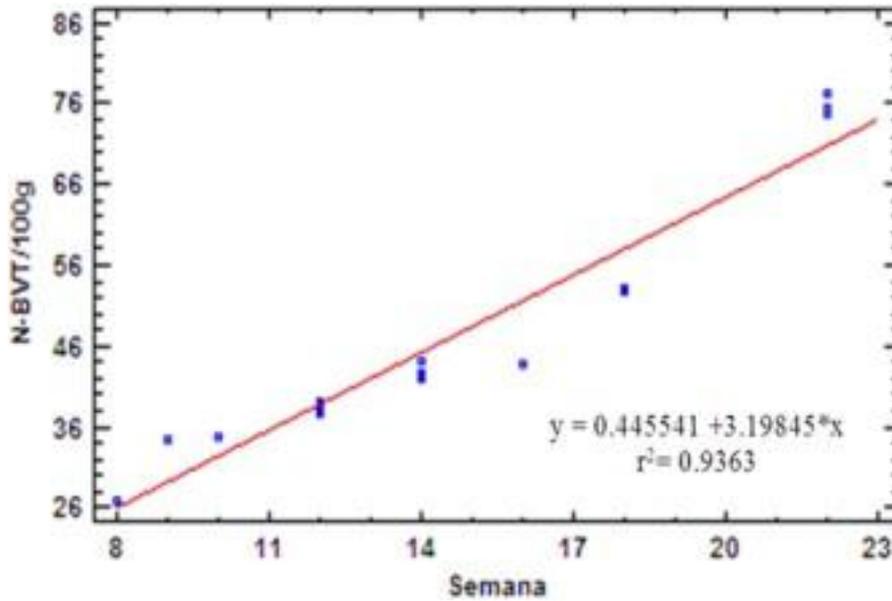


Figura 10: Correlación Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en función del tiempo de los filetes de anchoas almacenadas al ambiente

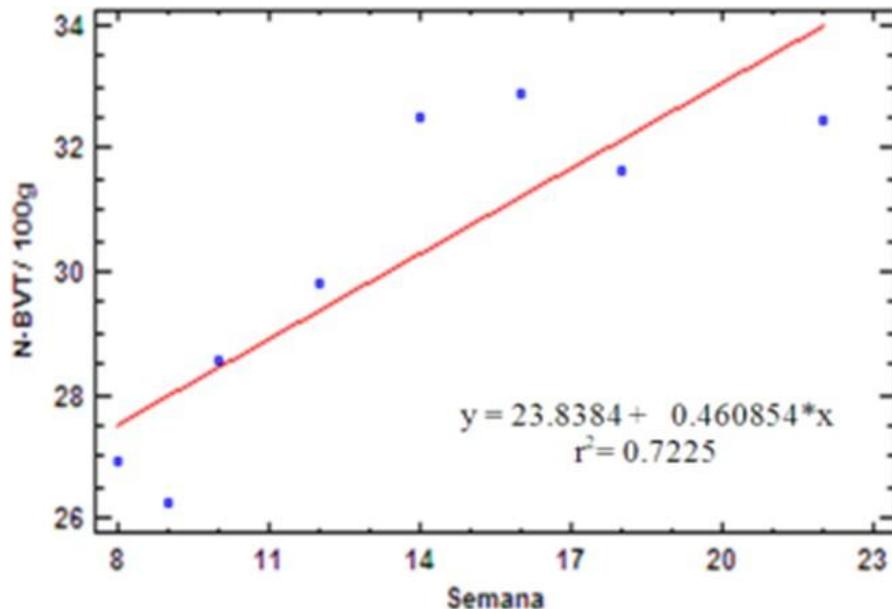


Figura 11: Correlación Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) en función del tiempo de los filetes de anchoas almacenadas en refrigeración

El contenido de NBV-T mantiene una relación directa con la temperatura de almacenamiento presentado una mayor correlación las muestras almacenadas 20°C ($r=0.97$) en comparación a las refrigeradas ($r=0.85$) (Ver Figura 10 y 11). Esta tendencia

coincide con los estudios realizados por Czerner (2011) y Hernández-Herrero *et al.*, (1999), quienes reportan también incrementos de NBV-T durante el proceso de salado-madurado de la anchoíta (*E. encrausicholus*), mostrando una correlación lineal entre el contenido N-BVT con el tiempo de maduración, $r = 0.921$ y $r = 0.914$, respectivamente.

Trimetilamina (TMA) es uno de los compuestos básicos volátiles que se acumula en peces marinos por la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA) y es utilizado como indicador de la calidad del pescado fresco (Huss, 1988). Existe una correlación directa de TMA con N-BVT en el pescado fresco, ambos relacionados al deterioro microbiano (Beirão, 1976). El valor de TMA al momento de envasar los filetes al vacío (semana 8) fue de 2.95 mg N-TMA/100 g.

Posteriormente se registró un paulatino aumento en las muestras almacenadas a 20°C hasta alcanzar un valor de 4.15 mg N-TMA/100 g, mientras que en las muestras refrigeradas no presentó este comportamiento, manteniéndose ligeramente constante alcanzando en la última fecha de muestreo un valor de 3.31 mg N-TMA/100 g. (Ver Figura 12)

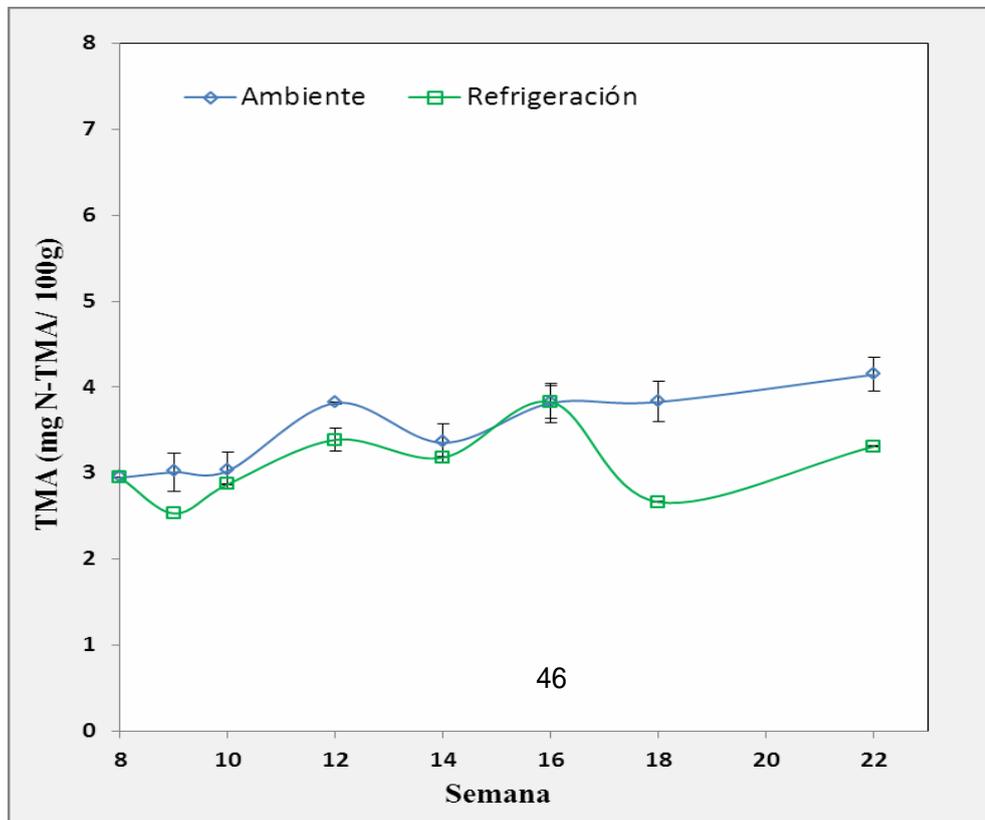


Figura 12: Evolución del Trimetilamina en los filetes de anchoas envasados almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C)

El incremento de N-BVT y en menor grado TMA a lo largo del proceso podría indicar un desarrollo microbiano, sin embargo la reducción de OTMA estaría ligado también a procesos enzimáticos endógenos (Sen, 2005).

4.3 CALIFICACIÓN SENSORIAL

Los 4 tributos: olor, sabor, color y consistencia se calificaron como puntaje total, de acuerdo con la escala que se muestra en el Anexo 2.

El puntaje sensorial de los filetes de anchoas antes de ser trabajados, inició con una puntuación de 15 (evaluado con el Cuadro 1 restando el puntaje de adherencia), quien permitió evaluar los cambios durante el tiempo de almacenamiento. Se mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las dos condiciones de almacenamiento respecto a la maduración tradicional en el barril.

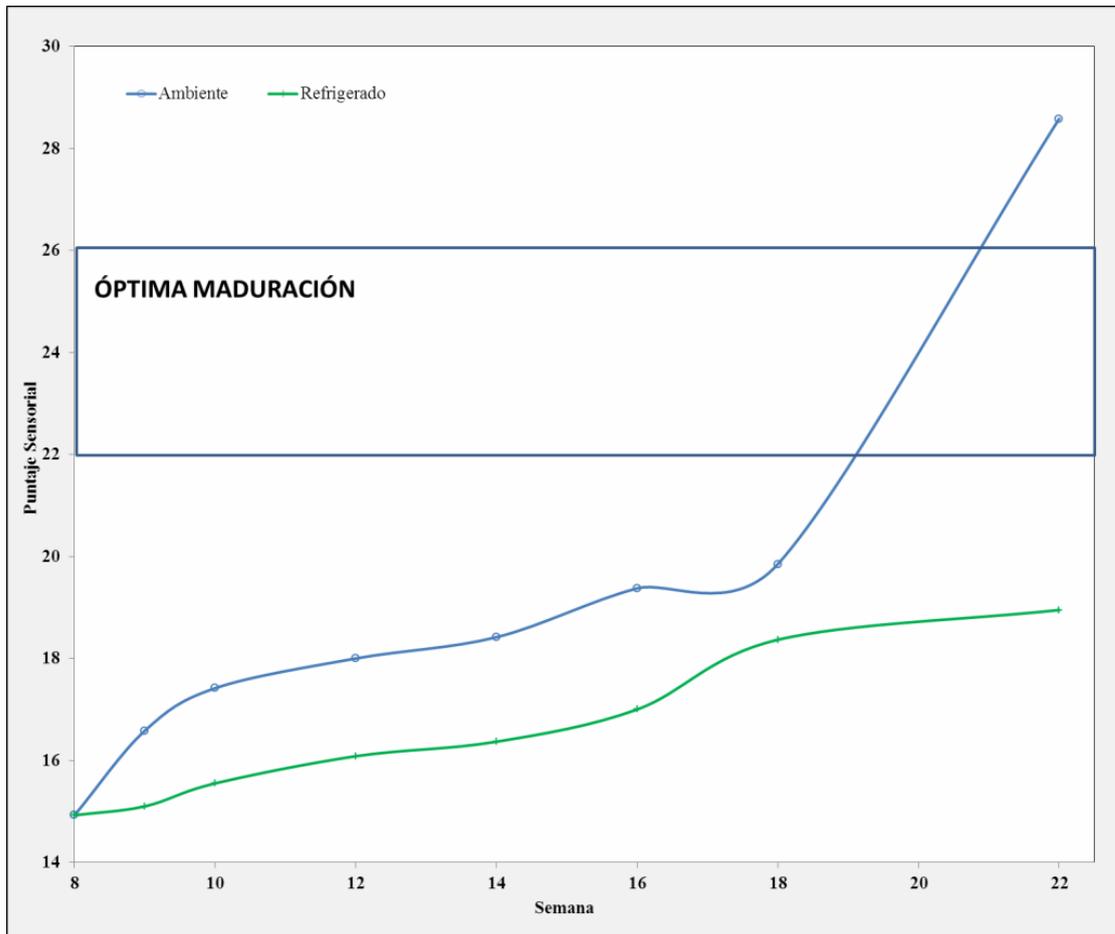


Figura 13: Evolución del puntaje sensorial los filetes de anchoas envasados almacenados a ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) y ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

Se aprecia en la Figura 13 que las muestras refrigeradas ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) incrementaron su puntaje paulatinamente (De 14.93 a 18.95) durante las 14 semanas de estudio sin embargo no llegaron a ubicarse dentro del rango “óptima maduración” (De 22 a 26). Por otro lado, las muestras almacenadas al ambiente ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) incrementaron su puntaje con mayor velocidad en comparación a las refrigeradas, alcanzando un valor de 20,4 (debajo del óptimo) en la semana 18; sin embargo, posteriormente en solo 4 semanas, incrementaron a valores alrededor de 28 cuyas características adicionales al “sobre-madurado” fueron, olor rancio y amoniacal, sabor desagradable y consistencia endebles

De acuerdo a los resultados obtenidos se deduce que los filetes envasados al vacío no adquieren la misma característica a comparación del proceso de maduración tradicional (Ver Anexo 10).

En relación a ello, estudios realizados por Hernández – Herrero *et al.*, (1999) y Ababouch y Marrakchi (2009) en *E. encrasicolus*, observaron que la evisceración y limpieza rigurosa de las anchoas llevan a una maduración más lenta, que finalmente el producto no adquiere el flavor característico. Esto hace referir que las vísceras contienen enzimas que participan en la maduración del músculo (Czerner, 2011) y se produce en mejores condiciones y más rápidamente, en especies conteniendo la totalidad o parte de sus vísceras, que en especies totalmente evisceradas (Beirão, 1976). Es así que en condiciones de refrigeración de los filetes de anchoa (*E. ringens*) envasadas al vacío nos indicaría que la vida útil del producto se extiende posiblemente por consecuencia de una menor actividad proteolítica, que en concordancia a otros estudios que indican que a una menor temperatura el producto demora en su maduración. (Czerner, 2011; Pérez-Villarreal, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003).

Czerner (2011) correlacionó el puntaje sensorial con los parámetros nitrógeno básico volátil total (NBV-T) y la relación NNP/NT, indicando que este último tiene una mejor correlación ($R^2 > 0.7312$). Las muestras almacenadas al ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) llegaron a sobre madurarse, por otra parte las muestras en refrigeración no entraron en el rango de maduración, esto podría tener una estrecha relación con los valores obtenidos en los cambios que hay en la fracción proteica y la temperatura de almacenamiento.

En la Figura 14 y 15 se encuentra los resultados obtenidos de dichas correlaciones, de acuerdo a las diferentes condiciones de almacenamiento aplicadas a los filetes de anchoas envasados al vacío, se aprecia que hay una mayor correlación entre el índice de proteólisis para las temperaturas de refrigeración y ambiente , ($R^2 > 0.7473$ y $R^2 > 0.9624$) respectivamente, así mismo, en relación a las bases volátiles se obtuvo una mejor correlación con la temperatura al ambiente ($R^2 > 0.9607$) , cabe recalcar que estas muestras fueron rechazadas por los panelistas al calificar el olor del filete con aroma a rancio y textura endeble (Ver Anexo 11), por lo que podría ser atribuido a que a mayores temperaturas de almacén ocurre una mayor proteólisis y conlleva a la formación de bases volátiles con valores altos, siendo calificadas con alto puntaje sensorial.

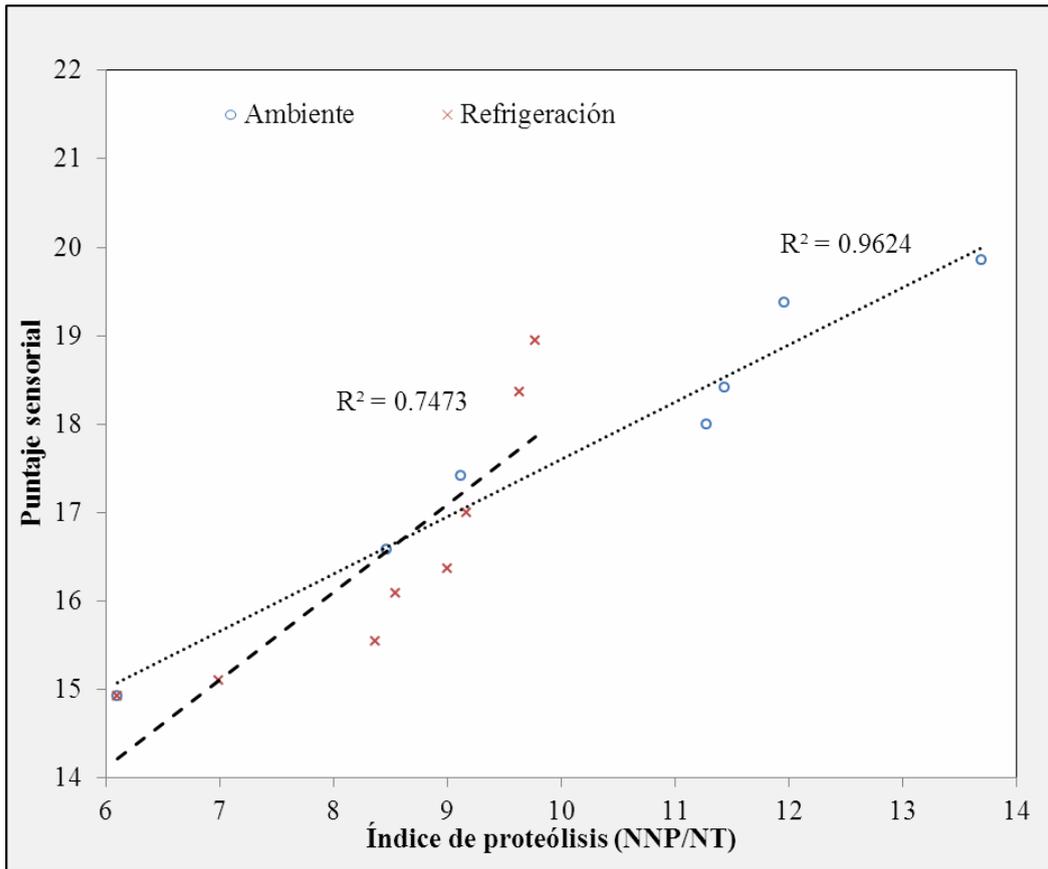


Figura 14: Correlación entre la puntuación sensorial e índices de proteólisis (NNP/NT) de los filetes de anchoas almacenados a $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ envasados al vacío

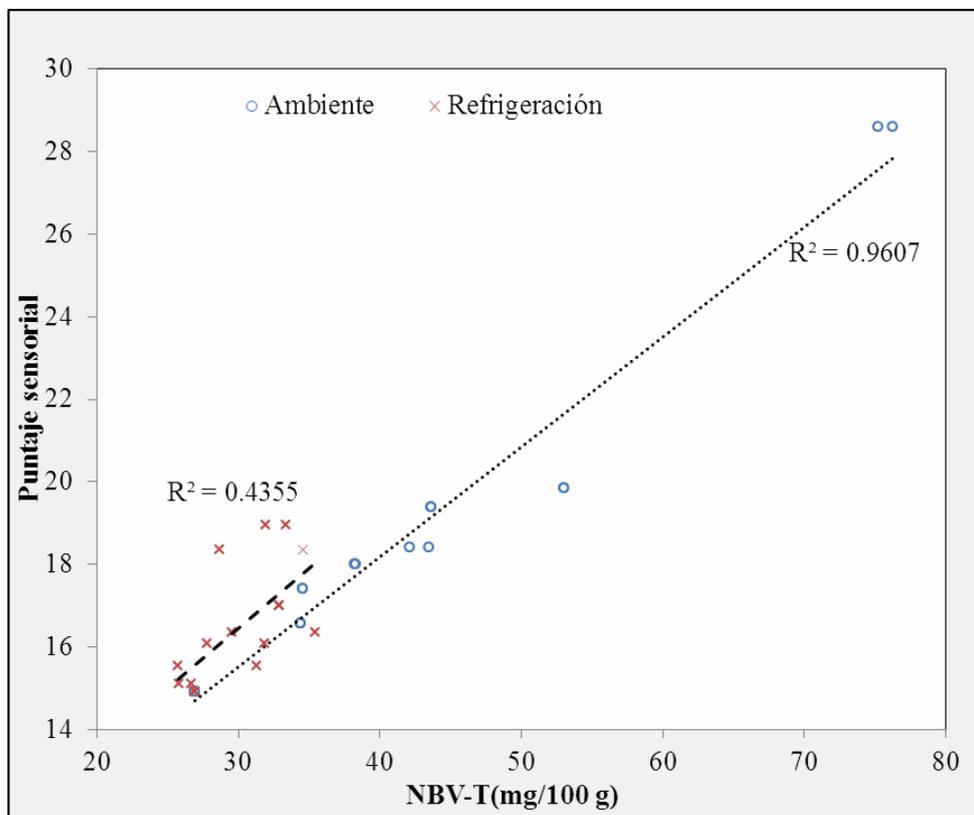


Figura 15: Correlación entre la puntuación sensorial y nitrógeno básico volátil total NBV-T de los filetes de anchoas almacenados a ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) y ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) envasados al vacío

4.4 INOCUIDAD DEL PRODUCTO

4.4.1 Análisis microbiológicos

Se pudo observar que en la última fecha de muestreo (semana 22), los filetes de anchoas (*E. ringens*) envasados al vacío a diferentes condiciones de temperatura, las muestras presentaron ausencia con respecto a recuento de aerobios mesófilos (ufc/g) y mohos (ufc/g); a su vez se presentó la ausencia de levaduras (ufc/g) en las muestras almacenadas en refrigeración y una formación de <10 ufc/g de levaduras en las muestras al ambiente (Ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido de microorganismos en los filetes de anchoas envasados al vacío almacenados a (20 ± 1 °C) y (5 ± 2 °C)

Microorganismo	Filetes de Anchoas envasados al vacío	
	Ambiente (20 ± 1 °C)	Refrigeración (5 ± 2 °C)
Aerobios Mesófilos (ufc/ g)	Ausente	Ausente
Mohos (ufc/g)	Ausente	Ausente
Levaduras (ufc/g)	<10	Ausente

Los valores de los parámetros obtenidos, se encuentran debajo del límite según la Norma técnica peruana 204.056 para anchoas en salazón y envasadas (INDECOPI, 2013), evidenciando prácticas adecuadas de higiene y sanidad.

4.4.2 Histamina

Todas las muestras presentaron un contenido menor a 10 ppm de histamina, cumpliendo los requisitos establecidos en la Norma técnica peruana 204.056 (INDECOPI, 2013), se podría indicar que al ser evisceradas, fileteadas y envasadas al vacío disminuye el riesgo de la formación de histamina.

V. CONCLUSIONES

1. El envasado al vacío y almacenados a temperaturas de refrigeración ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) y ambiente ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) de los filetes de anchoas, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en las variables de Nitrógeno básico volátil total (N-BVT), Nitrógeno trimetilamina (N-TMA), Índice de proteólisis (relación NNP/NT) y Grado de hidrólisis (GH).
2. Las variables Índice de esterificación (IE) y ácido tiobarbitúrico (TBA), así como los parámetros control (composición proximal, Cl^- , A_w y pH) no registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) durante el tiempo de almacenamiento para ambas temperaturas.
3. Los filetes presentaron un valor promedio de 51.7% de humedad, 17 a 20% de cloruros (Cl^-), 0.75 de actividad de agua (A_w) y un pH de 5.75, estos valores cumplen las especificaciones de calidad para las anchoas en salazón y envasadas, establecido por la Norma Técnica Peruana 204.056 – 2013.
4. En el análisis sensorial se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la maduración tradicional de anchoas y los filetes de anchoas en condiciones de refrigeración y ambiente, ambas muestras no alcanzaron el rango "madurado". La evisceración total conduce a que el producto no adquiera las características sensoriales esperadas para los filetes de anchoa, y el almacenamiento a temperaturas alrededor de los 20°C conduce al deterioro del producto.
5. El almacenamiento en refrigeración ralentiza ciertas reacciones, como la formación de bases volátiles nitrogenadas totales y el proceso de proteólisis.

VI. RECOMENDACIONES

1. Almacenar los productos a temperatura de refrigeración para relantizar los procesos que ocurren en almacenamiento y así garantizar la estabilidad del producto.
2. Envasar el producto cuando este haya alcanzado las características sensoriales típicas: consistencia firme y resistente al tacto, color rosado intenso uniforme, sabor ajamonado y aroma característico.
3. Envasar los filetes en un ambiente de atmosfera modificada, con el fin de evitar la presión directa con los filetes y obtener una mejor presentación sin daño alguno.
4. Ampliar la investigación respecto a los ensayos relacionados a los cambios que ocurren en la fracción grasa, teniendo en cuenta la temporada de pesca de la anchoveta para conocer mejor cual sería el comportamiento durante el proceso de la maduración de anchoas, debido a que los ensayos ácido tiobarbitúrico y el índice de esterificación presentaron inestabilidad durante el tiempo de almacén.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ababouch, L; Marrakchi, A. 2009. Desarrollo de anchoas semiconservas: económicas, técnicas e higiénicas. FAO Documento Técnico de Pesca y Acuicultura No. 525. Roma, Italia.
2. Alves,A. 2012. Avaliação da anchoita (*Engraulis anchoita*) salgada maturada acondicionada em atmosfera modificada.Tesis Mg.Sc. Rio Grande, Brasil. Universidade federal do rio grande. 88 p.
3. Beirão, L.1976. Parâmetros de avaliação da fermentação de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) no processo de anchovagem. Tesis Mg. São Paulo, Brasil.101p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos Agrícola, Universidade Estadual de Campinas
4. Belitz, H; Grosch, W; Schieberle, P. 2012.Química de los alimentos.3ra edición. Acribia Editorial. 938 p.
5. Besteiro, I; Rodríguez, C; Pascual, C. 2000. Chymotrypsin and general proteolytic activities in muscle of *Engraulis encrasicolus* and *Engraulis anchoita* during the ripening process. *European Food Research and Technology*. 210(6): 414–418.
6. BOC (Boletín Oficial de Cantabria, España). 2014. Boletín BOC. Cantabria, España. N°73.
7. BOE (Diario oficial Boletín Oficial del Estado). 1964. Ministerio de la Presidencia y para las administraciones territoriales. Gobierno de España

8. Bouchon, M; Ayón, P; Mori, J; Peña, C; Espinoza,P; Hutchings, L; Buitrón, B; Perea,A; Goicochea,C; Messie M. 2010. Biología de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens Jenyns*).Boletín Instituto del Mar del Perú. 25(1-2): 23-30.
9. Brody, A. 1996. Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y al vacío. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 213 p.
10. Campello, F.1985. Approche microbiologique de l' anchoítage. Revue Travaux Inst Peches Maritimes 47:217–226.
11. Chouliara, I; Savvaidis, I; Panagiotakis, N; Kontominas, M. 2004. Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. Food Microbiology 21: 351 – 359.
12. Clucas, I. 1982. Fish handling, preservation and processing in the tropics. London, Tropical Products Institute.
13. Comtrade (United Nations Commodity Trade Statistics Database).2016. Reportes anchovies (en línea). Consultado el 5 de may. 2017. Disponible en: <http://comtrade.un.org/data/>
14. Conway, E. 1935. Apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. Biochemical Journal 29(12): 2755–2772
15. Cosnard,M; Vallet, J-L; Kabbaj, F.1983. Données sur le phénomène de la maturation de l'anchois. Science et Pêche. N° 335.3-11
16. INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Perú).2013. Anchoas en salazón y envasadas: Requisitos Norma Técnica Peruana NTP 204.056:2013. Lima, Perú. 5 Nov. 15 p

17. Czerner, M. 2011. Aspectos tecnológicos de la maduración de anchoíta (*Engraulis anchoita*) salada. Efecto de la composición química y otras variables tecnológicas. Tesis Dr. La Plata, Argentina. UNLP.225 p.
18. Czerner, M; Yeannes, M. 2014. Bacterial Contribution to Salted Anchovy (*Engraulis anchoita* Hubbs & Marinni, 1935) Ripening Process. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 23(2): 102–114.
19. Damodaran, S; Parkin, L; Fennema, O. 2010. Fennema Química de los alimentos Acribia Editorial .1166 p.
20. De la Torre, M.; Soler, C. 1984. Anchoas en salazón: parámetros químicos de calidad. *Arxius de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona*. (6): 59-79.
21. Diario Oficial de la Unión Europea.2005. Reglamento (CE) No 2073/2008 del parlamento europeo y del consejo. Estrasburgo. 26 p.
22. Diario Oficial de la Unión Europea.2008. Reglamento (CE) No 110/2008 del parlamento europeo y del consejo. Estrasburgo. 39 p.
23. Durand, P. 1981. Etude de la fraction azotee soluble de l'anchois sale en cours de maturation. *Rev Trav Inst Pêches Marit*. 45 (4): 271-281.
24. Eroglu, E.; H. Yildiz. 2010. Recent Development in Osmotic Dehydration. *Academic Food Journal*. 8 (6): 24-28
25. Establier, R; Gutiérrez, M. 1972. Aspectos bioquímicos de la maduración enzimática del boquerón (*Engraulis encrasicolus*). *Investigación pesquera*. 36(2): 327 -340.
26. FAO(Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 1986. Food and Nutrition Paper. Manuals of food quality control 7. Analisis: Food Analisis: General techniques, additives, contaminants and composition. Roma.

27. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 p.
28. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2017. Capture Production database updated to 2015. Summary information Fisheries and Aquaculture Department
29. FDA (American Food and Drug Administration). 2001a. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 3. Consultado el 20 de May. 2017. Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm#conventional>
30. FDA (American Food and Drug Administration). 2001b. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 18. 8 th Edition. (Item a-c). Consultado el 20 de May. 2017. Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>
31. Fernandes, P. 2016. Enzymes in Fish and Seafood Processing. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 4:59.
32. Fernández, S; Vitancurt, J.1999. El proceso de salado con maduración de lacha (*Brevoortia spp*). Rocha, Uruguay. Documento de trabajo N° 17. 28 p
33. Filsinger, B .1987. Effect of Pressure on the Salting and Ripening Process of Anchovies (*Engraulis anchoíta*). Journal of Food Science.52 (4): 919 – 921.
34. Filsinger, B; Barassi, C; Lupín, H. 1984. Formación de Nitrógeno Básico Volátil Total durante la maduración de anchoíta (*E. anchoíta*). Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 24 (4): 524-528.

35. Filsinger, B; Barassi, C; Lupín, H; Trucco, R. 1982. An objective index for the evaluation of the ripening of salted anchovy. *Internacional Journal Food Science and Technology*. 17(2): 193-200.
36. Fuselli, S; Casales, M; Fritz, R; Yeannes, M.1994. Microbiology of the Marination Process used in Anchovy (*Engraulis anchoita*) Production. *LWT - Food Science and Technology*. 27(3): 214-218.
37. García,E; Gago, L; Fernández, J. 2006. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora (en línea). Consultado el 12 de abr. 2017. Disponible en: https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt3_tecnologias_de_envasado_en_atmosfera_protectora.pdf
38. Gutiérrez, C; Salazar, A; Gonzáles, D.2005. Variaciones físico-químicas de la sardina (*Sardinella aurita*) durante el proceso de salado-madurado en seco. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*. 163: 109-118
39. Hernández, E. 2005. Evaluación sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 81 p.
40. Hernández-Herrero, M; Roig-Sagués, A; López-Sabater, E; Rodríguez - Jerez, J; Mora-Ventura, M. 1999. Total Volatile Basic Nitrogen and another physico-chemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *Journal of Food Science*. 64(2): 344–347.
41. Huss, H.1988. El pescado fresco :su calidad y cambios de calidad.FAO.Pesca y Acuicultura. No.29. Roma, Italia.
42. Huss,H. 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. FAO. Pesca y Acuicultura. No. 334. Roma, Italia.
43. IMARPE (Instituto del Mar del Perú).2007.Información de anchoveta (*E. ringens*). (en línea). Consultado 15 abr. 2017. Disponible en: http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/recursos_pesqueras/adj_pelagi_adj_pelagi_anch_mar07.pdf

44. IMARPE (Instituto del Mar del Perú)/ITP (Instituto Tecnológico de la Producción, PE). 1996. Compendio biológico tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú. Lima. 143 p.
45. Jeyasanta.I; Prakash, S; Patterson, J.2016. Wet and dry salting processing of double spotted queen fish *Scomberoides lysan* (Forsskål, 1775). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 4(3):330 – 338
46. Jordán R. 1971. Distribution of anchoveta (*Engraulis ringens J.*) in relation to the environment. Inv. Pesq. 35(1): 113-126.
47. Jordán, R; Vildoso, A.1965. La anchoveta (*Engraulis ringens J.*) Conocimiento actual sobre su biología, ecología y pesquería. Callao, Perú.52 p. Informe del Instituto del Mar del Perú) n°6.
48. Mattos, S; Torrejon, E; Rodriguez, J. 1976. Study on the utilization of *Engraulis anchoita* for the preparation of anchovies. Handling, processing and marketing of tropical fish. 257-259.
49. Maza, S; Aldoradin, E; Pariona, C; Arpi, E; Rosales, M. 2016. Efecto del Desollado y Desangrado de Anchoveta (*Engraulis ringens*) en Solución de Citrato Sódico. Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú 27(3): 427.
50. Maza, S; Gallo, M.2006. Procesamiento y control de calidad de anchoas.Seminario virtual de las Ciencias del Mar – OANNES Señor de las Olas. (en línea).Lima, Perú. Consultado el 20 de mar. 2017. Disponible en http://www.oannes.org.pe/seminario/2006_PescayAcuicultura/PROCESAMIENTO_YCONTROLDECALIDAD.htm
51. Maza, S; Salas, A. 2004. Cambios en los parámetros físicos, químicos y sensoriales durante el proceso de maduración de la anchoveta peruana. Boletín de Investigación del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. 6: 81 – 84.

52. Narvaez,B. 2007. Estudio sobre la utilización de conservantes y saborizantes para la conservación de alimentos y su impacto en la salud humana. Tesis Lic. Quito. Ecuador. Universidad Tecnológica Equinoccial. 110 p.
53. Nielsen, S. 2010. Food Analysis Laboratory Manual. Segunda ed. New York: Kluwer Academic: Plenum Publishers. USA.
54. Norma Chilena Oficial. 2001. Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otra aminas biogénicas. Método HPLC con detector UV. NCh 2637.
55. Oetterer, M. 2005. O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ESALQ. LAN.662. Consultado el 6 de jun. 2017. Disponible en : <http://www.esalq.usp.br>
56. Oetterer, M. 2008. O processo de fermentação do pescado – Anchovamento (en línea, curso de graduação). São Paulo, Brasil. Consultado 5 de may. 2017. Disponible en : <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao%20do%pescado.pdf>
57. Oetterer, MCAD; Perujo, SD; Gallo, CR; Arruda, LFD; Borghesi, R; Cruz, AMPD. 2003. Monitoring the sardine (*Sardinella brasiliensis*) fermentation process to obtain anchovies. Scientia Agricola. 60(3): 511–517.
58. Orjuelo,J; Pinilla, A; Rincón, J. 2002. Aplicación de la tecnología de atmósfera controlada para la conservación de la granadilla (en línea). Consultado el 12 de abr. 2017. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4797340>
59. Ospina, S; Cartagena, J.2008. La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. Revista Lasallista de Investigación (en línea). Consultado el 29 de abr. 2017.Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/695/695502/>
60. Padula, M.; Ito, D.2006. Embalagem e segurança dos alimentos. Inf. CETEA. 28(2): 2-4.

61. Parry, R. 1995. Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods. Madrid, Springer Science & Business Media. 305 p.
62. Pereira, A;Tenuta-Filho, A. 2005. Avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. Ciência y Tecnología. Alimentaria. Campinas. 25(4): 720-725
63. Pérez – Villarreal, B. 1995. Estudio del proceso de maduración de la anchoa en salazón. Sukarrieta, España, AZTI, A. B. . Informe técnico N° 68. 88 p
64. Pirazzolli, P; Incerti, I; Scaramuzza, N.2016. Influenza del tenore di sale e della temperatura di magazzinaggio sulla vita commerciale e sulla formazione di istamina nella pasta di acciughe . SSICA- Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (en línea). Consultado el 25 de abr. 2017. Disponible en: <http://www.ssica.it/content/blogcategory/79/198/lang.en/>
65. Pons-Sánchez-Cascado, S. 2005. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. Tesis en Nutrición, Tecnología e Higiene de los Alimentos. Universidad de Barcelona, España
66. PROMPERÚ (Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo). 2015. Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero en el Perú. 90 p. Lima, Perú. Informe final 2015.
67. PROMPERÚ (Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo). 2016. Boletín del Sector de Productos Pesqueros. Lima, Perú. 16 p.
68. Resolución de Intendencia Nacional (2011). N° 000444-2011-PE. (en línea). Perú. Consultado el 10 de Mar. 2017. Disponible en <http://www.sintad.com/aranceles/resointend/archivos/R-000444-2011.pdf>

69. Riscabo, C. 2007. Avaliação físico-química e bacteriológica de peixes anchovados. Tesis Mg. Sc. Niterói, Brasil. Universidade Federal Fluminense. 103 p.
70. Rodríguez, D; Barrero, M; Kodaira, M. 2009. Evaluación física y química de filetes de bagre (*Pseudoplatystoma sp.*) salados en salmuera empacados al vacío y almacenados en refrigeración. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59(2): 206-213
71. Rodríguez, M. 2003. Envasado al vacío en el Perú. Tesis Ing. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 70 p.
72. Salas, F. 2008. Envasado al vacío y con atmosfera modificada. Revista AGRUM – Perú. Edic. N° 24.
73. Sanipes (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). 2010. Manual: Indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos y piensos de origen pesquero y acuícola. Lima, Perú. 63 p.
74. Sen, D. 2005. Advances in fish processing technology. New Delhi, Allied Publishers
75. Sebastio, P; Ambroggi, F; Baldrati, G; Gola, S; Saccani, G. 1998. Il rischio igienico-sanitario correlato alla presenza d'istamina nella filiera produttiva delle semiconsrve di acciughe (*Engraulis encrasicolus l.*). SSICA- Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (en línea) Consultado el 10 de may. 2017. Disponible en: http://www.ssica.it/component/option,com_docman/task,doc_details/gid,352/Itemid,34/lang,it/
76. SNP (Sociedad Nacional de Pesquería). 2017. Exportaciones pesqueras (en línea). Perú. Consultado 15 ago. 2017. Disponible en <http://www.snp.org.pe/exportaciones-pesqueras/>

77. Sola, E. 1998. Normativa Sanitaria y Técnica a cumplir en la elaboración de conservas de pescado. Consultado 24 abr. 2017. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/206288.pdf>
78. Steffánson, G; Guðmundsdóttir, G. 1995. Free amino acids and their relationship to taste in (salt) ripened pelagic fish species.
79. Sun, Q; Faustman, C; Senecal, A; Wilkinson, A; Furr, H. 2001. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. *Meat Science*. 57(1): 55–60.
80. Vásquez, M.1997. Informe Final: Proyecto de Innovación tecnológica preservas de anchoas. Arica, Chile. 180 p.
81. Voskresensky, N. 1965. Fish as Food: Salting of herring. Primera ed. Londres, USA, Academic Press. 107-131 p.
82. Vyncke, W. 1970. Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel Fette, Seifen, Anstrichm.* 72(12): 1084–1087.
83. Yeannes, M; Casales, M. 1995. Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoíta (*E. anchoita*). *Revista de Higiene y Tecnología Alimentaria*.262: 87-91.
84. Zaitsev, V; Kizevetter, I; Lagunov, L; Makarova, T; Minder, L; Podsevalov, Y. 1969. Fish curing and processing, Moscow.
85. Zenteno, J. 2016. Peruvian Anchoveta Fishery: Industry Structure. Background analysis of the Artisanal Sector of the Peruvian Anchoveta
86. Zugarramurdi, A; Lupín, HM. 1980. A Model To Explain Observed Behavior On Fish Salting. *Journal of Food Science*. 45(5): 1305–1311.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL GRADO DE HIDROLISIS

Para la determinación de enlaces peptídicos hidrolizados, se pesó 0.5 g de muestra en un frasco con una capacidad de 250 ml, se añadieron 25 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) con una concentración de 7N y se trituró la muestra con el ácido, se aseguró el cierre de la tapa con cinta teflón y se llevó a 100 °C en la estufa por un tiempo de 24 horas. El contenido se transvasó a una fiola de 100 mL sobre papel whatman No. 4, se enrasó con agua desionizada. Se diluyó la muestra en 1/100, se tomó una alícuota de 1 mL y se introdujo en un tubo de ensayo de 25 mL.

- Para la determinación del número total de enlaces de la proteína, se pesó 1 g de muestra en un vaso metálico, se añadieron 100 ml de agua desionizada y se homogeneizó por 2 minutos, luego se transvasó a una fiola de 100 ml, se enrasó en caso de ser necesario. El homogeneizado se transvasó a tubos falcon de 50 mL, se centrifugó a 250 rpm durante 10 minutos en la centrifuga, se tomó una alícuota de 0.5 mL del sobrenadante, se introdujo en un tubo de ensayo de 25 mL y se añadió 0.5 mL de agua desionizada

- Se construyó una curva de calibración (cantidad en ug vs Absorbancia) a partir de la solución de glicina con una concentración de 0,15 ug/ ul a partir del cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 0, 25, 50, 100, 250, 500 ul, se introdujo en tubos de ensayo de 25 ml y se completó con agua desionizada a 1 mL.

- A los tubos de ensayos preparados con las muestras y la curva, se añadieron 1 mL de tetraborato de sodio al 2 % (v/v), luego se adicionó 0,25 ml de una solución de 2,4 dinitrofluorobenceno (DNFB al 1,3% en etanol) y se mezclaron en un vortex. Las muestras se llevaron a baño termostático a 60 °C por 10 minutos y, después del enfriamiento se agregaron 2 mL de ácido clorhídrico 6 N con el fin de detener la reacción. Finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 410 nm.

Se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Grado de Hidrolisis} = \frac{E1 \cdot 100\%}{E2}$$

E1 = número de enlaces peptídicos hidrolizados

E2 = número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína

ANEXO 2

EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS FILETES DE ANCHOAS ENVASADAS AL VACÍO

PUNTAJE	2	4	6	8
COLOR DE LA CARNE (evaluar el lado interno de filetes)	Beige claro a los bordes, Ligeramente más oscuro y rojizo en el centro.	Distribución no uniforme del Marrón y/o rojo oscuro en la parte central Y beige claro a los bordes.	Distribución uniforme del tono rojizo en la línea central, beige a los bordes.	Distribución no uniforme. Coloración café oscuro, marrón verdoso.
OLOR	Pescado salado. Olor de salmuera. Aroma no intenso.	Ligero a carne curada. Aroma suave.	Característico y agradable de las anchoas maduradas. Aroma suave, agradable.	Rancio, ácido, amoniacal y olores sulfurosos. Aroma desagradable.
CONSISTENCIA DE LA CARNE	Menos Elástica. Poco húmeda.	Muy poco elástica, Ligeramente húmedo y firme.	No elástico. Firme y resistente al tacto.	Blanda. Sin consistencia, endeble y se deshace fácilmente.
SABOR (Excluyendo el sabor salado)	Pescado seco salado fuerte.	Ligeramente característico a carne curada (ajamonada).	Característico a carne curada-madurada (jamón). Achoado en Salazón	Rancio, desagradable.

Adaptado: Filsinger et. al. (1982) y Vásquez (1997)

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS (ufc/g)

Procedimiento para análisis del método de recuento en placa.

- Usando pipetas estériles separadas, se preparó diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otras que sean necesarias a partir del homogenizado del alimento transfiriendo 10 mL de la dilución previa a 90 mL de diluyente. Evitar muestrear espuma. Se agitó todas las diluciones 25 veces en un arco de 30 cm (1 pie) en el lapso de 7 segundos.
- Se pipeteo 1 mL de cada dilución y se vertió en placas Petri separadas, previamente marcadas y por duplicado. Si acaso los frascos de dilución reposaran más de 3 minutos, reagitarlos unas 25 veces en un arco de 30 cm en el lapso de 7 segundos antes de pipetear una alícuota de estos frascos hacia una placa Petri.
- Se añadió 12-15 mL de Agar Papa Dextrosa con Rosa de Bengala y Ampilicina (enfriado a 45 ± 1 °C) en cada placa y dentro de los 15 minutos de realizada la dilución original
- Se mezcló inmediatamente la muestra diluida y el agar de manera uniforme y completa mediante rotación alternada y movimientos hacia delante y detrás de las placas sobre una superficie plana y nivelada.
- Se dejó solidificar el agar. Se invirtió las placas Petri solidificadas e incubó inmediatamente por 3 días a 25°C. No se deben apilar las placas cuando se vierta el agar o cuando el mismo esté solidificando.

Lineamientos para Calcular y Reportar el Recuento de Aerobios en Placa en Casos Atípicos

- Se reportó todos los “recuentos de aerobios en placa” a partir de placas por duplicado. Se reportó como recuentos estimados, todos aquellos obtenidos a partir de duplicados y que contengan más de 250 colonias por placa. Los recuentos que escapen del rango normal de 25 -250 colonias por placa pueden conducirnos a una indicación errónea de la real composición bacteriana en la muestra. Los factores de dilución pueden exagerar los bajos recuentos (menor a 25), en tanto que las placas que presentan un crecimiento masivo (más de 250 colonias) pueden ser difíciles de contabilizar e incluso, pueden inhibir el crecimiento de algunas bacterias, llevando a un bajo recuento final. Se reportó los recuentos menores a 25 o mayores a 250 colonias como un “recuento estimado de aerobios en placa” (REAP).

ANEXO 4

PROCEDIMIENTO MOHOS (ufc/g) Y LEVADURAS (ufc/g)

Preparación de la muestra

1. Se analizó 25-50 g de cada submuestra; generalmente tamaño de muestra mayores incrementan la reproducibilidad y baja la variación comparado con muestras pequeñas. Probar submuestras individuales o compósitos de acuerdo al Programa de Rendimiento respectivo para el alimento bajo estudio.
2. Se añadió la cantidad apropiada de agua peptonada 0,1% a la muestra recién pesada para lograr la dilución 10^{-1} , luego se homogenizó en un stomacher / homogenizador durante 2 minutos. Alternativamente, la mezcla puede ser homogenizada por 30-60 seg., pero este procedimiento es menos efectivo.
3. Se hizo las diluciones apropiadas 1:10 (1+9) en agua peptonada 0,1%. Hasta la dilución 10^{-5} es suficiente.

Método por difusión en placa:

4. Se pipeteó asepticamente 0,1 mL de cada dilución en placas de agar DRBC solidificado y se difundió el inóculo con una varilla curvada de vidrio estéril. El agar DG18 es preferido cuando la actividad de agua (a_w) de la muestra analizada es menor de 0,95. Se plaqueó cada dilución por triplicado.
5. Se incubó las placas en oscuridad a 25 ° C. No apilar (una encima de otra) más de 3 placas, teniendo cuidado de no invertirlas

Conteo de placas:

6. Se contabilizó las placas luego de transcurridos 5 días de incubación. Si no existiera crecimiento hasta el quinto día, re-incubar las placas por otras 48 h. No efectuar el recuento a los 3 días, debido a que la manipulación de las placas puede producir crecimiento secundario a raíz de las esporas desprendidas, lo que invalidaría el recuento efectuado al 5to día.

7. Se realizó el recuento sobre placas que contengan 10-150 colonias. Si se observaran principalmente levaduras, por lo común pueden contabilizarse placas con 150 colonias. Sin embargo, si se observara cantidades apreciables de mohos en las placas, dependiendo del tipo de moho desarrollado, el límite superior de conteo puede disminuir a discreción del analista.

8. Se reportó los resultados en unidades formadoras de colonias / UFC / g o UFC/ mL/ en base al recuento promedio de las placas por triplicado. Redondear los recuentos a 2 cifras significativas.

ANEXO 5

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE HISTAMINA

Soluciones para la curva de calibración

A partir de la solución stock de histamina de 1000 mg/L se tomaron distintas alícuotas que se llevó a una fiola de 10 mL y enrasó con ácido tricloroacético al 5 %, preparando de esa manera soluciones estándar comprendidas en el rango de 5 a 150 mg/L de histamina.

1. Se pesó 1 g de muestra aproximadamente en un tubo de centrifuga de 50 mL.
2. Se adicionó 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Se agitó con vortex durante minuto y medio.
3. Fue centrifugado durante 15 min a aproximadamente 3000 rpm.
4. Se filtró una porción del sobrenadante a través de un embudo con papel filtro en caso éste no esté translúcido.
5. Se colocó en un tubo eppendorf 100 μ L del sobrenadante transparente obtenido en el paso anterior, colocar en otros tubos eppendorf 100 μ L de cada uno de los estándares para la curva de calibración. Luego se adicionó en cada uno de estos tubos los volúmenes siguientes:
 - 400 μ L de la solución de bicarbonato de sodio
 - 200 μ L de cloruro de dansilo

- 300 μL de acetona.
6. Se cerró herméticamente los tubos y homogenizó la mezcla en un vortex, luego se incubó en un baño termostático a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos aproximadamente.
 7. Se enfrió a temperatura ambiente (de preferencia proteger de la luz directa).
 8. El contenido de los tubos eppendorf se transfirió en un vial haciéndolo pasar previamente a través de un filtro de jeringa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de poro antes de inyectarlo en el HPLC.

La concentración de histamina en la muestra se calcula según la expresión:

Siendo:

$$\text{Histamina (mg/Kg)} = \frac{\text{Conc (mg/L)} \times 10}{W_m \text{ (g)}}$$

Conc: Concentración de la solución proveniente de la muestra en mg/L

W_m : Peso de muestra en gramos

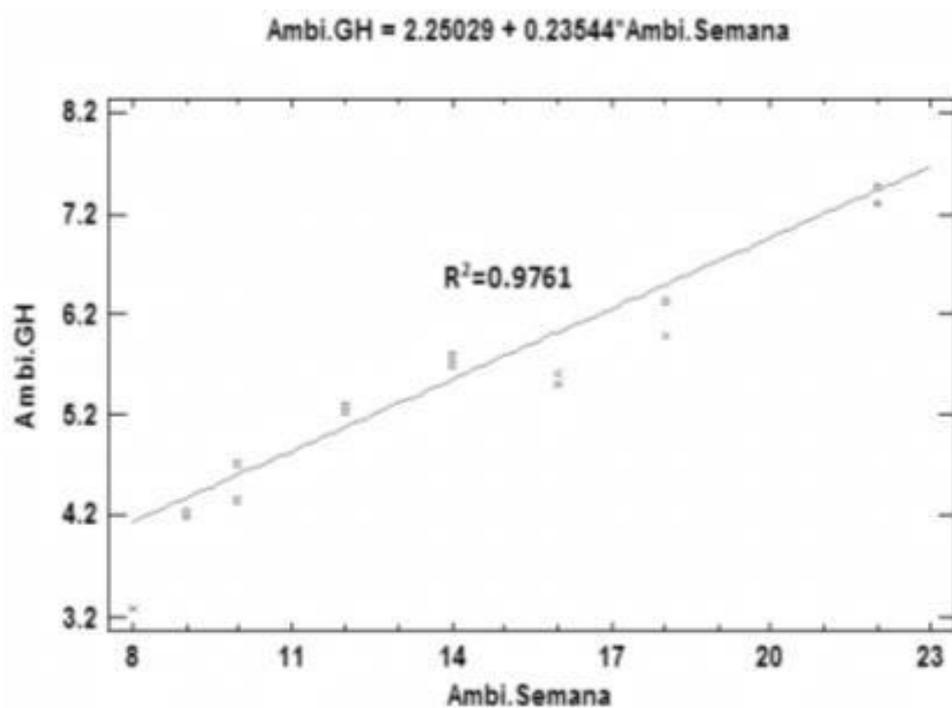
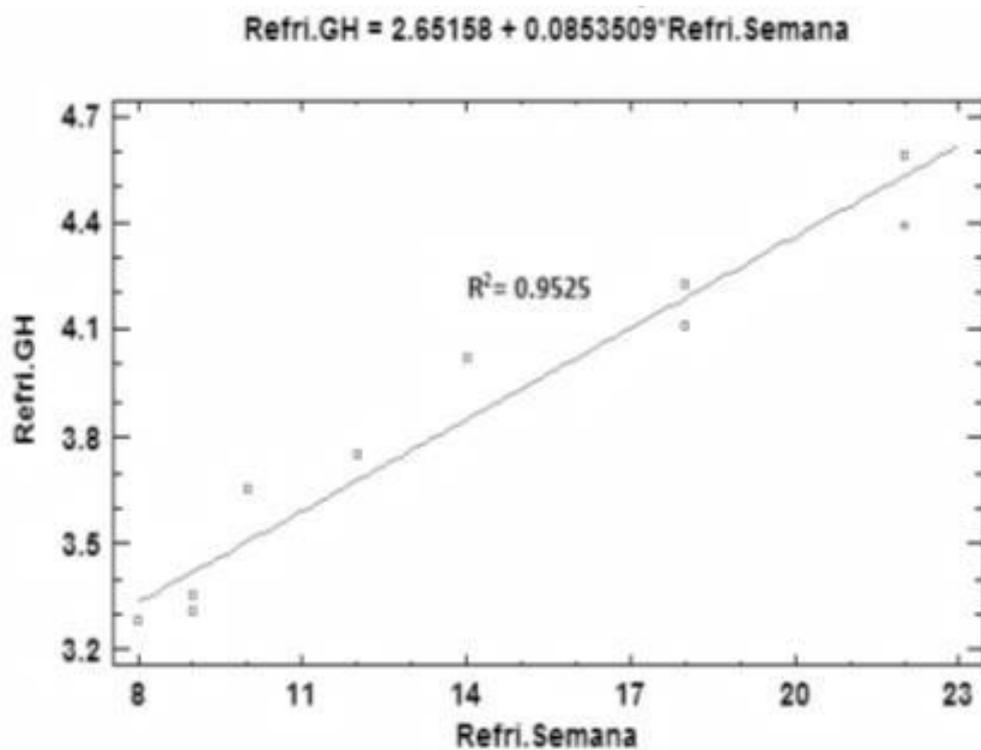
ANEXO 6

CONTENIDO DE NaCl, Aw Y pH DURANTE EL ALMACENAMIENTO A (20 ± 1 °C) Y (5 ± 2 °C) DE LOS FILETES DE ANCHOAS ENVASADOS AL VACÍO

Filetes Envasados al vacío	Semana	pH	Aw	Cloruros (%)
Refrigeradas (5°C - 10°C)	9	5.70 ± 0.03	0.75	18.95 ± 0.35
	14	5.64 ± 0.03	0.75	20.16 ± 0.60
	18	5.84 ± 0.01	0.74	19.62 ± 0.07
	22	5.74 ± 0.02	0.74	20.72 ± 0.45
Ambiente (20°C)	9	5.67 ± 0.03	0.75	19.48 ± 0.20
	14	5.62 ± 0.02	0.74	20.31 ± 0.07
	18	5.82 ± 0.03	0.73	20.58 ± 0.10
	22	5.90 ± 0.02	0.74	20.97 ± 0.14

ANEXO 7

CORRELACIÓN ENTRE GRADO DE HIDROLISIS Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO CORRESPONDIENTES A LOS FILETES DE ANCHOAS ENVASADOS AL VACÍO A $(20 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C})$ Y $(5 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$



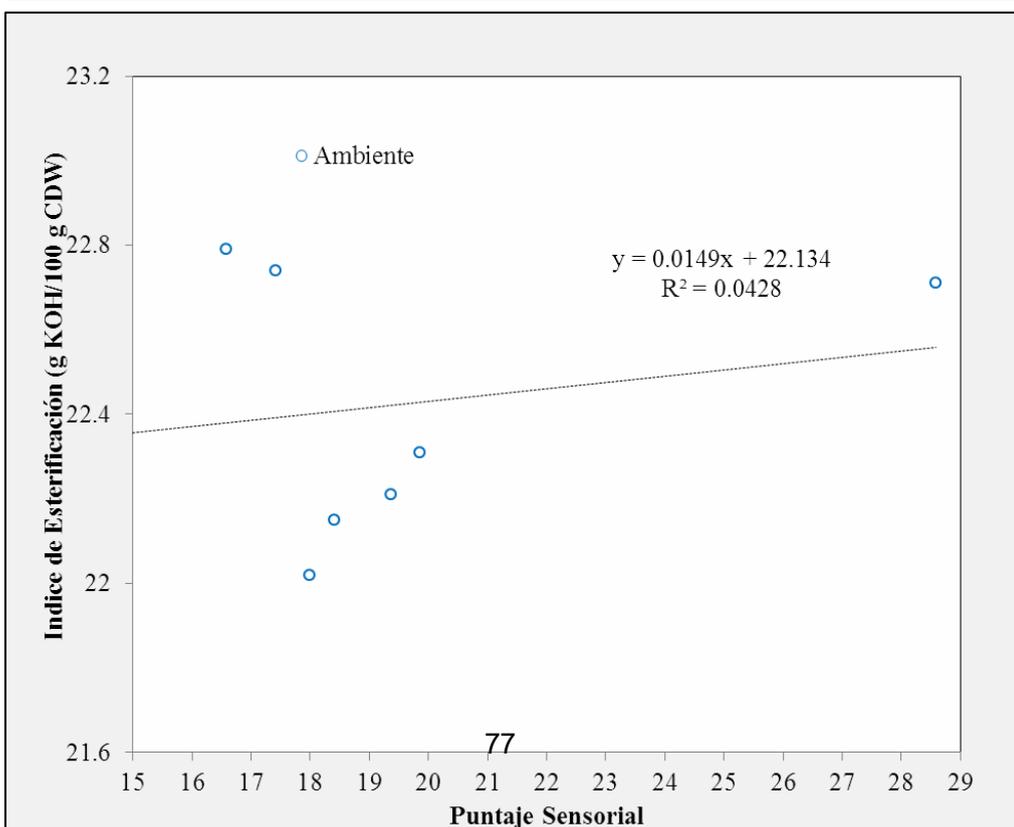
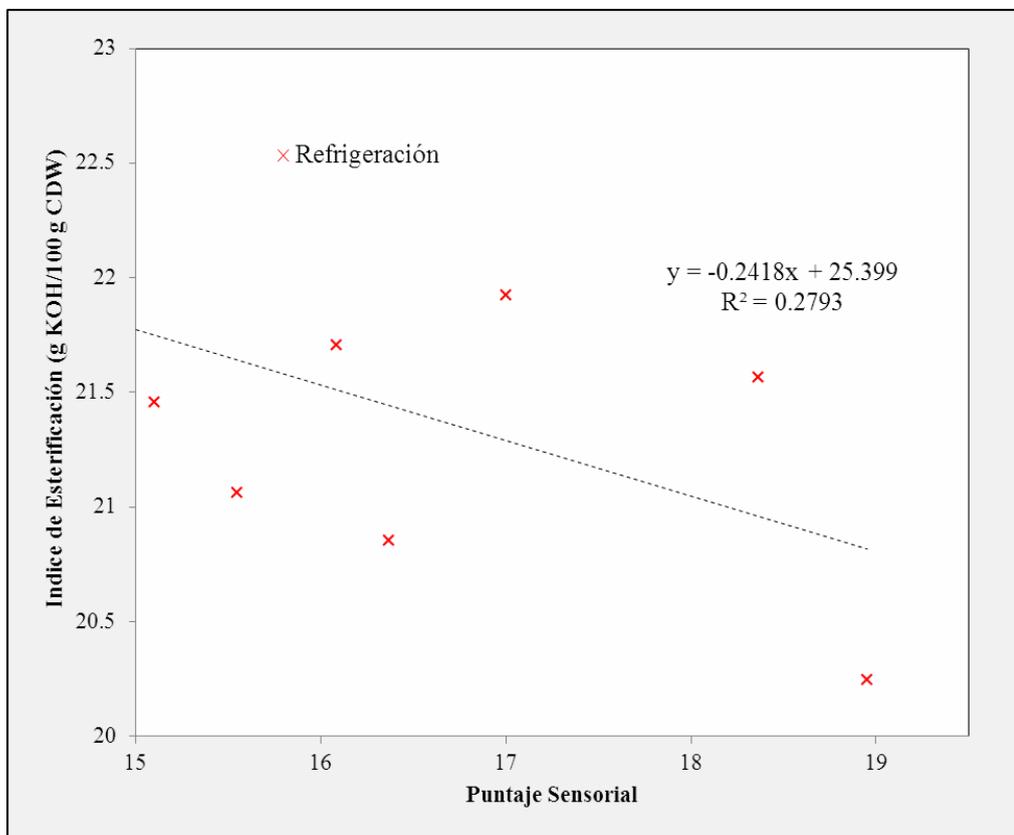
ANEXO 8

INDICE DE ESTERIFICACIÓN (g KOH / 100 g CDW) DE LOS FILETES DE ANCHOAS ENVASADOS ALMACENADOS A (20 ± 1 °C) Y (5 ± 2 °C)

Semana	Índice de Esterificación (g KOH / 100g CDW)	
	20 ± 1 °C	5 ± 2 °C
8	22.42 ± 0.00 ^a	22.42 ± 0.00 ^b
9	22.79 ± 4.86 ^a	21.45 ± 8.68 ^{a,b}
10	22.74 ± 10.77 ^a	21.06 ± 10.88 ^{a,b}
12	22.02 ± 10.70 ^a	21.70 ± 3.08 ^{a,b}
14	22.15 ± 2.94 ^a	20.85 ± 10.84 ^{a,b}
16	22.21 ± 10.83 ^a	21.92 ± 8.36 ^{a,b}
18	22.31 ± 11.36 ^a	21.56 ± 4.67 ^{a,b}
22	21.71 ± 4.91 ^a	20.24 ± 4.71 ^{a,b}

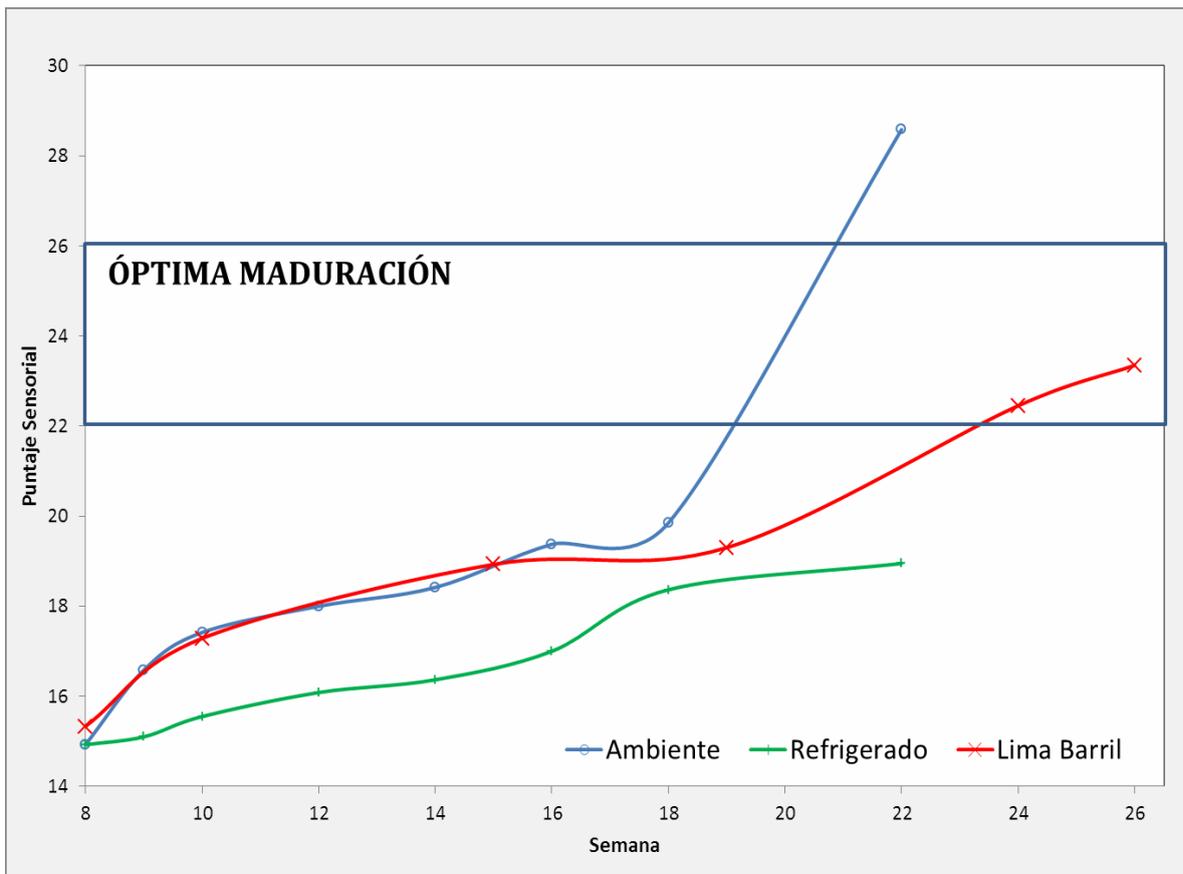
ANEXO 9

CORRELACIÓN ENTRE ÍNDICE DE ESTERIFICACION Y EL PUNTAJE SENSORIAL CORRESPONDIENTES A LOS FILETES DE ANCHOAS ENVASADOS AL VACÍO A $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ Y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$



ANEXO 10

EVOLUCIÓN DEL PUNTAJE SENSORIAL LOS FILETES DE ANCHOAS ALMACENADOS A $(20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ Y $(5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ ENVASADOS AL VACÍO Y DE LA MADURACIÓN TRADICIONAL (MUESTRA CONTROL)



ANEXO 11

CARA INTERNA DE LOS FILETES DE ANCHOAS DE LOS LOTES CORRESPONDIENTES A LA MADURACIÓN TRADICIONAL (A) Y DE LOS FILETES DE ANCHOAS A TEMPERATURA AMBIENTE (B) Y REFRIGERACION (C) ENVASADOS AL VACÍO

A)



B)



C)

