

Trabajos presentados al *I Congreso Internacional de Biotecnología e innovación (ICBi)*, 9 - 12 de julio de 2018, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
Editoras:
Ilanit Samolski Klein
María Lucila Hernández-Macedo
Gretty Katherina Villena Chávez

Autores

Norma Nélide Gamarra Mendoza*
aunonegame2016@outlook.com
<https://orcid.org/0000-0001-6559-6720>

Silvia Andrea Velásquez Rodríguez
SILVIAN_04@hotmail.com

Blanca Lilia Roque Lima
bliliarl@gmail.com

Correspondencia

*Corresponding author

Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo, Perú

Citación

Gamarra Mendoza NN, Velásquez Rodríguez SA, Roque Lima BL. 2020. Mejoramiento de la extracción de carotenoides y capsaicinoides del ají nativo (*Capsicum baccatum*), asistido con enzimas celulolíticas. I Congreso Internacional de Biotecnología e innovación (ICBi), Revista peruana de biología número especial 27(1): 055- 060 (Marzo 2020). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17588>

SECCIÓN II: INDUSTRIAL AND ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY ARTICLE

Mejoramiento de la extracción de carotenoides y capsaicinoides del ají nativo (*Capsicum baccatum*), asistido con enzimas celulolíticas

Improvement of the extraction of carotenoids and capsaicinoids of chili pepper native (*Capsicum baccatum*), assisted with cellulolytic enzymes

Resumen

Se realizó la producción de celulasas de *Aspergillus niger* ATCC 10864 mediante fermentación en biopelículas (FB). Los extractos de celulasas se usaron para hidrolizar la celulosa del fruto de *Capsicum baccatum* "ají escabeche", para ello los frutos de ají fueron deshidratados y molidos a un tamaño de partícula menor a 0.425 mm. Luego se mezcló ají seco: celulasas y se hidrolizó en condiciones de agitación, tiempo y temperatura controlada. Se filtró el medio y se separó el sobrenadante de la torta de ají hidrolizado, este último se secó a 10% de humedad y se lixivió con una mezcla de hexano:acetona:etanol para extraer los carotenoides y capsaicinoides, los cuales fueron cuantificados por HPLC. El rendimiento de oleoresina extraída era cinco veces mayor comparado al método convencional; así mismo en los tratamientos T2 y T5, se logró mayor extracción de carotenoides y capsaicinoides totales, respectivamente, comparado a los otros tratamientos. La acción hidrolítica de las celulasas, sobre las estructuras moleculares de la celulosa del fruto ají escabeche, favorecieron mayor liberación de los carotenoides y capsaicinoides totales comparado a los métodos convencionales.

Abstract

The production of cellulases of *Aspergillus niger* ATCC 10864 was carried out by fermentation in biofilms (FB). The extracts of cellulases were used to hydrolyze the cellulose of *Capsicum baccatum* "escabeche chili" fruit, for this the chili fruits were dehydrated and ground to a particle size < 0.045 mm. Then dry chili: cellulase was mixed and hydrolyzed under conditions of agitation, controlled time and temperature. The medium was filtered and the supernatant of the hydrolyzed chili cake was separated, the latter was dried at 10% humidity and leached with a mixture of hexane:acetone:ethanol to extract the carotenoids and capsaicinoids, which were quantified by HPLC. The extraction yield of oleoresin was five times higher compared to the conventional method; likewise in the T8 and T5 treatments, greater extraction of carotenoids and total capsaicinoids was achieved compared to the other treatments. The hydrolytic action of the cellulases, on the molecular structures of the cellulose of the red drop chili fruit, favored greater release of the carotenoids and total capsaicinoids compared to conventional methods.

Palabras claves:

Capsicum; carotenoides; capsaicinoides; hidrolisis; celulasas.

Keywords:

Capsicum; carotenoids; capsaicinoids; hydrolysis; cellulases.

Introducción

Los compuestos naturales más importantes de los ajíes, son los carotenoides y capsaicinoides, los cuales son utilizados ampliamente en la industria alimentaria, industria de alimentos para aves y peces, farmacéutica, cosmeceútica, etc. Los carotenoides son compuestos con una diversidad estructural química, ampliamente distribuidos y con acciones y funciones múltiples. En algas, bacterias y hongos existe una gran variedad de carotenoides, mientras que en alimentos no son tan numerosos, pero la composición puede ser compleja y variable (Rodríguez-Amaya 2016). Los carotenoides son los responsables del color rojo, amarillo o anaranjado de algunos vegetales, animales o sus productos, debido a que se encuentran distribuidos y acumulados en los tejidos de estos organismos (Giovannucci 2002). Estos compuestos se localizan en organelos subcelulares (plastidios), principalmente asociados a proteínas, en el cloroplasto y depositados en forma de cristales o gotas de aceite en el cromoplasto (Bartley & Scolnik 1995). Se reconoce que los carotenoides tienen actividad antioxidante, lo cual se relaciona con la reducción del riesgo de enfermedades degenerativas crónicas (Rodríguez-Amaya 2016).

Los capsaicinoides son compuestos naturales amidados, que se biosintetizan únicamente en las especies de *Capsicum*, en la placenta de los frutos y son los responsables del sabor pungente y se incrementan conforme alcanza la madurez del fruto, se conocen alrededor de 22 compuestos análogos de capsaicinoides (Bosland & Votava 2000), de los cuales la capsaicina y la dihidrocapsaicina constituyen más del 90% del total, presente en los frutos (Suzuki et al. 1981). Estos compuestos aparte de ser utilizados como saborizantes en la preparación de alimentos tienen propiedades quimopreventivas antimutagénicas, antitumorales, antiinflamatorio y antioxidante (Fernández 2007). La importancia y demanda de estos compuestos naturales han llevado al desarrollo de nuevas propuestas biotecnológicas, frente al uso de métodos convencionales de extracción con solventes orgánicos y técnicas de alta presión que tienen desventajas en el bajo rendimiento de extracción, uso de grandes cantidades de solventes y largos periodos de tratamientos.

Una alternativa explorada es el uso de enzimas hidrolíticas (Sharma et al. 2000) como alternativa viable, segura y compatible con el medio ambiente. En los últimos años, se viene incrementando el uso de enzimas celulolíticas para mejorar las extracciones de compuestos naturales de matrices vegetales (Li et al. 2011). Las enzimas hidrolíticas, poseen la capacidad de degradar los polisacáridos que constituyen la pared celular de los tejidos vegetales, tales como la celulosa, la hemicelulosa, por lo que reciben mayor atención principalmente en la industria alimentaria. Los preparados celulolíticos con actividad múltiple (Bhat 2000) se han aplicado con éxito para facilitar y aumentar la liberación de productos de interés y para mejorar el proceso tecnológico mediante la predigestión enzimática de la pared celular de los tejidos vegetales (Ovando et al. 2005).

En el presente estudio se realizó la extracción de carotenoides y capsaicinoides de ají nativo (*Capsicum baccatum*), usando celulasas en la etapa de pretratamiento, seguido de una lixiviación con hexano-etanol, previamente se obtuvo las celulasas por fermentación en biopelículas.

Materiales y Métodos

Acondicionamiento del ají.- Se utilizó el ají nativo *Capsicum baccatum* denominado localmente ají escabeche (Fig. 1), procedente del distrito de Puerto Bermúdez de la provincia de Oxapampa, región Pasco. Los frutos maduros de ají, se lavaron y se separó el cáliz y las semillas, luego se trozó, secó, molió y tamizó a un tamaño de partícula menor a 0.4250 mm.



Figura 1. Frutos de ají escabeche (*Capsicum baccatum*).

Obtención de celulasas de *Aspergillus niger* en fermentación en biopelículas.- Las esporas de *Aspergillus niger* se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) durante 5 días, luego se lavó con 15 mL de Tween 80 (0.1%) para obtener una suspensión de esporas y se preparó un inóculo de 1×10^6 esporas.mL⁻¹, las cuales fueron adheridas a un soporte de poliéster de 2.5 cm² en un matraz de 250 mL. Se preparó el medio de cultivo con la siguiente composición (Duff 1988): KH₂PO₄ (2 g l⁻¹); (NH₄)₂SO (1.4 g l⁻¹); urea (0.3 g l⁻¹); CaCl₂·2H₂O (0.3 g l⁻¹); MgSO₄·7H₂O (0.3 g l⁻¹); peptona (1 g l⁻¹); Tween 80 0.2% (v/v); FeSO₄·7H₂O (5mg l⁻¹); MnSO₄·2H₂O (1.6 mg l⁻¹); ZnSO₄·7H₂O (1.4 mg l⁻¹); CoCl₂·6H₂O (2 mg l⁻¹) y lactosa (10 g l⁻¹). Se utilizó 60 mL del medio de cultivo e inóculo de 3% (v/v) de esporas de *A. niger*, luego se incubó a 28 °C por 72 horas en agitación constante de 170 rpm (Villena & Gutiérrez-Correa 2006).

Actividad celulasa.- Se determinó en términos de actividad de papel de filtro (FPA) (Ghose 1987), donde una Unidad Internacional de enzima (UI⁻¹) se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto, equivalente a FPA y endoglucanasa. La liberación de azúcar se midió por el método de Miller, (Miller 1959) a través de una reacción de óxido-reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Además se determinó la cantidad de biomasa (g.L⁻¹) por diferencia de peso seco, el consumo de lactosa (Miller 1959) y proteínas totales (Lowry et al. 1951).

Hidrólisis del ají escabeche. - La harina de ají escabeche, se mezcló con celulasas en una proporción de 1:15 y 1:20 en medio acuoso, y se hidrolizó a 35 °C en diferentes condiciones de agitación de 170 y 190 rpm; por 2 y 4 horas, haciendo un total de ocho tratamientos, concluido el tiempo de hidrólisis, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante y la torta hidrolizada de ají, luego se secó a 30 °C por 15 min, hasta alcanzar de 8 - 10% de humedad. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorio (DCA) con un arreglo factorial de 3², del cual se generó ocho tratamientos y se comparó con un testigo libre de enzimas, se repitió tres veces cada tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron mediante Análisis de Varianza con un nivel de error del 5% y para determinar la diferencia significativa entre tratamiento se utilizó el estadístico de medias de Duncan.

Extracción de carotenoides y capsaicinoides.- Se utilizó los métodos de Santamaría et al. (2000), Salgado-Roman et al. (2008) y Sampathu et al. (2006) con algunas modificaciones. Se mezcló ají hidrolizado: solvente 1:50; el solvente orgánico contenía hexano:etanol en la proporción 75:25, la extracción se realizó en un matraz de 250 mL a 40 °C con agitación circular a 170 rpm por 3 h. Luego se filtró y el sobrenadante se evaporó en rotavaporador a 45 °C, 500 mmHg y se obtuvo la oleorresina de ají escabeche.

Análisis por HPLC.- Para la determinación de carotenoides y capsaicinoides, se utilizó los métodos de la AOAC (970.64) (1990), Hoffman et al. (1983), ISO (7543) con algunas modificaciones, respectivamente. La oleorresina se diluyó en una mezcla de hexano, etanol, acetona y tolueno (HEAT) de grado HPLC en proporciones de 10:6:7:7, seguidamente se saponificó con potasa metanólica al 40% a 56 °C por 20 min, luego se adicionó 15 mL de hexano y sulfato de sodio al 10%. Se filtró con membranas Millipore de PTFE de 0.45 µm, 47 mm. Se inyectó 20 µL en una columna Adsorbosphere (HS SI, 5µm, 4.6x250 mm, de Alltech, Grace Company, Deerfield IL, USA) y detector de 474 nm. Se utilizó una fase móvil con 85.5% de hexano, 1.5% de 2-propanol, y 13% de acetona, se operó a un flujo de 1.0 mL.min⁻¹ de la mezcla, por 45 min.

La determinación de capsaicinoides, se realizó inyectando 20 µL de la muestra en una columna Pinnacle II (C18, 5µm, 4.6x250mm, Restek) y un detector de diodos de 280 nm. La elución de los capsaicinoides fue a 1.5 mL.min⁻¹ con una fase móvil de 50% acetonitrilo y 50% agua (con 1.0% de ácido acético), a temperatura ambiente, por 20 min. Para la identificación y cuantificación de los carotenoides y capsaicinoides se utilizó una curva de calibración con estándares de carotenoides (β-Caroteno, β-Criptosantina, Capsantina y Zeaxantina) adquirido de Carotenature GmbH-Suiza y Capsaicinoides (Capsaicina, Dihidrocapsaicina, Norhidrocapsaicina de Sigma-Aldrich.

Resultados y discusión

Actividad enzimática de las celulasas.- En la Tabla 1 se observa la máxima productividad de celulasas, biomasa, lactosa residual y cantidad de proteínas biosintetizadas por el *A. niger* en fermentación en bipelículas en

72 h de cultivo; similares resultados obtuvieron Gamarra et al. (2010), Villena y Gutiérrez-Correa (2006), Villena y Gutiérrez-Correa (2007), donde la fermentación en biopelículas ofrece mayor producción de celulasas que en fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. Los cultivos de microorganismos basados en la adhesión superficial son más productivos que los cultivos sumergidos (Wang & Chen 2009). Se percibe que las interacciones fisicoquímicas entre hongos y superficies sólidas son responsables de la mayor biosíntesis de metabolitos. En estudios anteriores, (Villena & Gutiérrez-Correa 2007), demostraron que el patrón de crecimiento de los biofilms de *A. niger* desarrollados en material de poliéster era comparable con la fermentación en estado sólido.

Tabla 1. Productividad del extracto celulolítico.

Tiempo de Producción (h)	APF (UI.L ⁻¹)	Biomasa seca (g.L ⁻¹)	Consumo de Lactosa (g.L ⁻¹)	Proteína secretada (g.L ⁻¹)
72	2162.382	4.287	8.528	0.501

* FPA= Actividad de Papel Filtro

Las especies de *Aspergillus*, particularmente *A. fumigatus*, durante su crecimiento forma biofilms y se debe a la expresión de un gen diferencial y esta condición puede ser responsable del aumento de su patogenicidad (Mowat et al. 2008, Seidler et al. 2008). En los ensayos experimentales el cultivo de hongos adheridos a superficies sólidas es similar a las condiciones naturales de crecimiento y por consiguiente la secreción de enzimas es mayor (Leite et al. 2002) e influenciado por el medio ambiente.

Hidrólisis de ají seco.- la ruptura de la celulosa del ají seco a través de las enzimas celulolíticas se determinó en base a los azúcares reductores liberado de la matriz vegetal. En el tratamiento T8 en cuatro horas de hidrólisis se liberó 39 ± 1.32 mg.mL⁻¹ de azúcares reductores, manteniéndose constante la concentración en el resto del tiempo, comparado con el testigo (T0) libre de celulasas, la liberación de azúcares era 21% menor al T8. Las celulasas constituyen un sistema enzimático complejo, conformado por tres enzimas: endo-1,4-β-glucano glucanohidrolasa; celobiohidrolasa 1,4-β-D-glucano y β-glucosidasa, que actúan sinérgicamente para biotransformar la celulosa en glucosa cristalina (Sukumaran et al. 2005), rompiendo enlaces glicosídicos β-1,4, en diferentes partes del polímero de celulosa (Lee 1997).

Extracción de oleorresina del ají hidrolizado.- Según el estadístico de comparación múltiple de Duncan se encontró diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) en la extracción de oleorresina entre los tratamientos de la hidrólisis de ají, el T8 en condiciones de: ají seco:celulasas de 1:20, 4 horas de hidrólisis y 190 rpm de agitación se obtuvo un mayor rendimiento de oleorresina de 11.44±1.4%, respecto a los otros tratamientos y a la extracción convencional por el método Soxhlet. Cardona et al. (2006) obtuvo diversos rendimientos con diferentes solventes orgánicos en la extracción Soxhlet de la oleorresina a partir de paprika (*Capsicum annum*), 2.9% con hexano; 4.2% con acetato de etilo y 6.1% con acetona. Ovando-Chacón & Walts-

zewski (2005) mencionan que la degradación enzimática de polisacáridos de la pared celular de plantas juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en las matrices vegetales, al degradar la celulosa, hemicelulosa y otros presentes en el tejido, incrementan el tamaño y la formación de poros, y la porosidad total del vegetal, lo que permite una mejor difusión desde el interior hacia la parte externa, dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos, por tanto la acción de las enzimas mejora la eficiencia del proceso y el rendimiento de la extracción.

Cuantificación de carotenoides y capsaicinoides.-

En la Figura 2 se presenta el cromatograma de carotenoides del tratamiento T2, siendo el más representativo en cuanto a la resolución de carotenoides del ají escabeche, se observa siete cromatogramas bien definidos, dos de ellos son desconocidos y cinco fueron identificados con los patrones de carotenoides. El área de los cromatogramas revela la concentración de los carotenoides presentes en el ají estudiado, los cuales fueron cuantificados con la curva de calibración de los patrones de carotenoides adquiridos.

En la Tabla 2, se observa la cantidad ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$) de carotenoides individuales y totales. La mayor extracción de carotenoides se obtuvo en el tratamiento T2. Los carotenoides que predominaron en orden de cantidades de mayor a menor concentración eran las fracciones amarillas de zeaxantina (3) y β -caroteno (1), seguido por las fracciones de color rojo capsantina (4), capsorubina (5) y finalmente β -criptoxantina (2). En frutos del género *Capsicum* se han identificado más de 30 carotenoides, que pueden agruparse por sus propiedades cromóforas en rojos, amarillos y naranjas (Bosland & Votava 2000). Entre los de tipo rojo destacan capsantina y capsorubina, mientras que β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina suelen predominar entre los de color amarillo/naranja (Wall et al. 2001, Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera 2001).

El alto contenido de carotenoides presentes en los frutos del género *Capsicum* los ha convertido en potenciales colorantes alimentarios naturales, usados en forma de pimentón y oleorresinas. En la industria de los colorantes derivados del pimiento (*C. annuum* L.) es muy importante que el producto presente un color rojo intenso, lo que implica altos contenidos en capsantina y capsorubina (Rodríguez-Burruezo y Nuez, 2006).

En La Figura 3 se presenta los cromatogramas de capsaicinoides del ají escabeche, que corresponden al tratamiento T5, donde se observa tres capsaicinoides y el que predomina en altura y área es la capsaicina (CAP) (2), seguido por la dihidrocapsaicina (DHC) (3) y nordihidrocapsaicina (NDHC) (1); los cuales fueron cuantificados y se determinó que la NDHC alcanzó a un 6.91%; CAP 53.48% y DHC 39.59% (Tabla 1), estos resultados son muy cercanos a los estudios de (Estrada et al. 2000), quien reporta en forma general el contenido de capsaicinoides mayoritarios del género *Capsicum*, donde obtuvo: NDHC 7.4%; CAP 48.6% y DHC 36%, HDHC 2% y HCAP 2%.

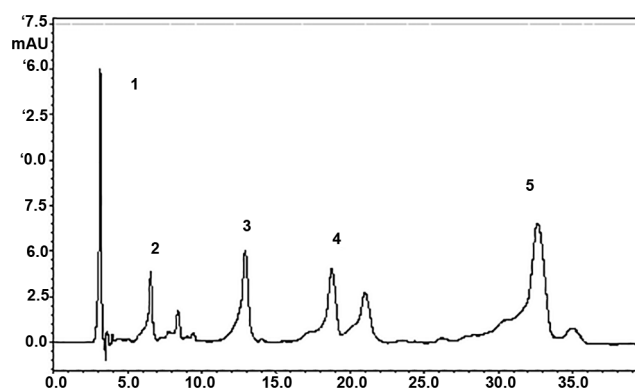


Figura 2: Cromatogramas de Carotenoides de ají escabeche, correspondiente al tratamiento T2, donde: (1) β -caroteno; (2) β -criptoxantina; (3) Zeaxantina; (3) Capsantina; (4); (5) Capsorubina.

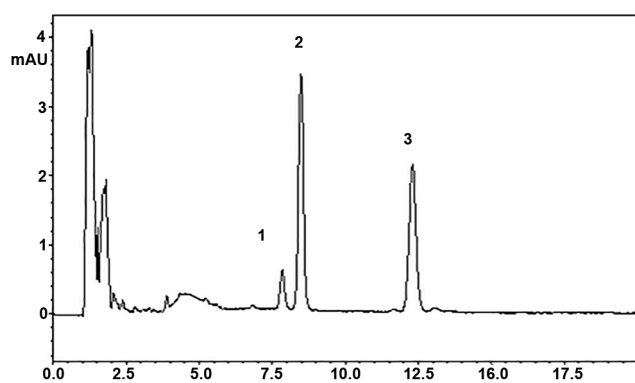


Figura 3: Cromatogramas de Capsaicinoides de ají escabeche extraído en condiciones del tratamiento T5 (1:20/190/4). Donde: Norhidrocapsaicina (1), Capsaicina (2), Dihidrocapsaicina (3).

Tabla 2. Efecto de las celulasas en la hidrólisis de la matriz de ají escabeche para la extracción de carotenoides.

Condiciones de hidrólisis	β -caroteno $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$	β -criptoxantina $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$	Zeaxantina $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$	Capsantina $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$	Capsorubina $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$	Carot.Tot. $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ms}$
T1(1:15/170/2)	1229.26 \pm 1.9b	641.42 \pm 1.6b	2024.01 \pm 1.2a	841.44 \pm 1.3b	637.31 \pm 1.4b	5373.44 \pm 1.6b
T2(1:20/170/2)	2199.91 \pm 1.2a	1098.51 \pm 1.4a	3660.78 \pm 1.5b	1765.84 \pm 1.4a	1312.17 \pm 1.1a	10037.21 \pm 1.3a
T3(1:15/170/4)	1899.68 \pm 1.8a	913.28 \pm 1.3a	2187.73 \pm 1.0a	1042.84 \pm 1.7a	774.61 \pm 1.7a	6818.15 \pm 1.5a
T4(1:20/170/4)	949.34 \pm 2.1b	553.54 \pm 2.3b	1505.51 \pm 2.6b	663.78 \pm 2.4b	488.44 \pm 2.7b	4160.61 \pm 2.3b
T5(1:15/190/2)	1702.85 \pm 1.1a	869.58 \pm 1.3a	2322.24 \pm 1.5b	1225.93 \pm 1.2b	903.32 \pm 1.9b	7023.92 \pm 1.6b
T6(1:20/190/2)	1050.73 \pm 3.4b	610.79 \pm 3.1b	1694.71 \pm 2.9a	727.32 \pm 2.7a	535.62 \pm 2.7a	4619.18 \pm 3.1a
T7(1:15/190/4)	897.82 \pm 2.5b	612.56 \pm 2.6b	1418.78 \pm 2.3b	516.93 \pm 2.1b	385.34 \pm 3.1b	3831.44 \pm 2.4b
T8(1:20/190/4)	1851.66 \pm 1.9a	1147.93 \pm 1.1a	2744.22 \pm 1.4a	1505.09 \pm 1.6a	1107.34 \pm 1.1a	8356.25 \pm 1.4a

T1,2,3...= tratamientos; Relación sustrato:extracto enzimático: 1:15 y 1:20; Velocidad de agitación: 170 y 190 rpm; Tiempo: 2 y 4 h; ms = materia seca; β - Caroteno, β - criptoxantina, Zeaxantina, Capsantina, Carotenoides totales. Letras diferentes son significativos.

La pungencia de los ajíes esta en relación directa a la concentración de capsaicinoides totales y se expresa en Unidades de Calor Scoville (SHU), según los tratamientos de extracción de estos compuestos del ají escabeche la pungencia alcanzó un rango desde 6000 a 21000 SHU, este último valor se encuentra en el rango de 20000 a 30000 SHU que corresponde al ají habanero (Maruthavanan 2006) considerado como un ají de alta pungencia. La concentración y distribución de capsaicinoides dentro de las especies de *Capsicum* obedecen a su genética y la heredabilidad de estos compuestos de cada especie, parece ser relativamente baja (Zewdie & Bosland 2001). Además la síntesis de estos compuestos se ve afectado por variables medio ambientales como la temperatura, luz, humedad del suelo o los niveles de fertilización de éste (Estrada et al. 2002). Así mismo varía de acuerdo a la variedad, cultivar, área geográfica. Contreras-Padilla y Yahia (1998) sostienen que la acumulación de capsaicinoides totales de plantas cultivadas en invernadero alcanza un máximo de 200 g.g⁻¹, en comparación con los cultivados en campo abierto de 120 g.g⁻¹, esto podría deberse al suelo y las condiciones climáticas que se le otorga.

Por otro lado, el mayor o menor rendimiento de obtención de los carotenoides y capsaicinoides de los frutos de *Capsicum* va a depender de los métodos de extracción utilizados y la viabilidad del tratamiento extractivo estará en relación al rendimiento de extracción, reducción del tiempo de proceso y reducción de los costos. Adicionalmente, las células de *Capsicum* están cubiertas por una matriz de material insoluble formado principalmente por celulosa y cantidades pequeñas de lignina y cutina (Salgado-Roman et al. 2008); por lo tanto, el uso de enzimas especializadas como celulasas, lignocelulasas y otros son capaces de hidrolizar estas moléculas y facilitar la difusión de los carotenoides y capsaicinoides desde el interior de la matriz hacia el exterior.

Conclusión

Los extractos de celulasas obtenidas de *Aspergillus niger* en fermentación en biopelículas, permitió una adecuada hidrólisis de la matriz vegetal de ají escabeche (*C. baccatum*), en condiciones de muestra: enzima (1:20) y agitación 190 rpm y cuatro horas, que influyó significativamente en la eficiencia de extracción y mayor rendimiento total de la oleoresina comparado con el control y a la vez permitió una adecuada difusión de carotenoides y capsaicinoides lixiviados con hexano-etanol. Las fracciones de carotenoides de color amarillo de zeaxantina y β -caroteno son las que predominan y en segundo lugar las fracciones de color rojo capsantina y capsorrubina. En cuanto a los capsaicinoides la capsaicina se encuentra en mayor concentración seguido de la dihidrocapsaicina y el incremento de la pungencia está en relación directa a la concentración de estos capsaicinoides prioritarios.

Literatura citada

- AOAC (Association of official analytical chemists). 1990. Carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. AOAC method 970.64. in AOAC official methods of analysis, 15th ed. (K. Helrich,ed.) pp1048-1049. AOAC, Arlington, Va.
- Bhat MK. 2000. Cellulases and other related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Bartley GE. and Scolnik P. A. 1995. Plant Carotenoids Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1027>
- Bosland P, Votava E. 2000. Chemical composition. In: *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. CABI Publishing New York, USA: 84-96.
- Cardona JA, Gil M., Benavides J.F., Caicedo M.R., Ríos L.A. y Restrepo G.M. 2006. Extraction of oleoresin from sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Vitae* (Medellín, Colombia), 13: 5-9.
- Contreras-Padilla M, Yahia EM. 1998. Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(6):2075-2079. <https://doi.org/10.1021/jf970972z>
- Sampathu SRD, Naidu MM, Sowbhagya HB, Naik JP, Krishnamurthy N. 2006 Aug 29. Process of extracting chili (*capsicum*) oleoresin. <https://patents.google.com/patent/US7097867B2/en>.
- Dominguez H, Nuñez MJ, Lema JM. 1997, Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chem.*; 49: 271-86. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90172-4)
- Duff J. 1988. Use of surface-immobilized *Trichoderma* in batch and fed-batch fermentation *Biotechnology and Bioengineering* 31: 345- 348. <https://doi.org/10.1002/bit.260310410>
- Estrada B, Bernal MA, Díaz J, Pomar F, Pomar F. 2002. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5): 1188-1191. <https://doi.org/10.1021/jf011270j>
- Fernández-Trujillo P. 2007. Extracción convencional de oleoresina de pimentón dulce y picante. I. generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. *Grasas y Aceites* 58(3): 252- 263. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i3.180>
- Gamarra NN, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. 2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(2):545-551. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2540-4>
- Giovannucci E. 2002. A Review of Epidemiologic Studies of Tomatoes, Lycopene, and Prostate Cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 227(10):852-859. <https://doi.org/10.1177/153537020222701003>
- Ghose TK. 1987. Medición de actividades de celulasa. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Hoffman PG, Lego MC, Galetto WG. 1983. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31(6):1326-1330. <https://doi.org/10.1021/jf00120a044>
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. 2001. Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry 49: 3584-3588. <https://doi.org/10.1021/jf0104001>
- Lee J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56:1-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- Leite B, Ishida M. L., Alves E., Carrer H., Pascholati S.F., Kitajima E.W. 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicates that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of Brazilian. *Journal of Medical and Biological Research*, 35, 645-650. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600003>
- Li Y, Jiang L, Sui X, Qi B, Han Z. 2011. The study of ultrasonic-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from peanut by response surface method. *Procedia Engineering*. 15:4653-4660. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.873>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
- Maruthavanan J. 2006. Capsaicinoid: Studies on Chemical de-flowering for enhancing harvestable capsaicinoid production and mechanisms for capsaicinoid - specific metabolism in pepper fruit. Thesis doctoral, Oklahoma State University. <https://hdl.handle.net/11244/7129>
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mowat E, Williams C, Jones B, Mcchlerly S, Ramage G. 2009. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? *Medical Mycology*. 47(sup1):S120-S126. <https://doi.org/10.1080/13693780802238834>
- Ovando-Chacón SL, Waliszewski KN. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42):111-120.
- Rodríguez-Amaya DB. 2016. Food Carotenoids: Chemistry, Biology, and Technology, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 42:180-191. <https://doi.org/10.1002/9781118864364>
- Rodríguez-Burruezo A, Raigon, MD, Nuez F. 2007 Total phenolic concentration and browning susceptibility in collection of different varietal.
- Salgado-Roman M, Botello Alvarez E, Rico Martínez R, Enez Islas, Cardenas Manriquez Navarrete Bolaños J. 2008. Enzymatic Treatment to Improve Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili (*Capsicum annum*) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10012-10018. <https://doi.org/10.1021/jf801823m>
- Santamaría R, Reyes-Duarte, M. Bárzana, E. Fernando, D. Gama, F. Mota, M. y López-Munguía, A. 2000. Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum* L.) Using Ethanol as Solvent. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 3063-3067. <https://doi.org/10.1021/jf991242p>
- Sharma V, Sharma S, zu Bentrup KH, McKinney JD, Russell DG, Jacobs WR, Sacchetti JC. 2000. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Structural Biology*. 7(8):663-668. <https://doi.org/10.1038/77964>
- Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller F-MC. 2008. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 52:4130-4136. <https://doi.org/10.1128/AAC.00234-08>
- Sukumaran RK, Singhanian RR, Ashok P. 2005. Microbial cellulases- Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 832-844.
- Suzuki T, Kawada T, Iwai K. 1981. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol*. 22 (1): 23-32.
- Villena GK, Gutiérrez-Correa M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology* 43: 262-268. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01960.x>
- Villena GK, M. Gutiérrez-Correa. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Letters in Applied Microbiology* 45: 231-237. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02183.x>
- Wall MM, Waddell CA, Bosland PW. 2001. Variation in β -Carotene and Total Carotenoid Content in Fruits of *Capsicum*. *Hort Science*. 36(4):746-749. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.4.746>
- Wang Z-W, Chen S. 2009. Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83:1-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1940-9>
- Zewdie Y, Bosland PW. 2001 a. Pungency of Chile (*Capsicum annum* L.) fruit is affected by node position. *Hort Science* 35, 137-139. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.6.1174>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Nuestro agradecimiento especial al Ing. Ricardo Wissar Guerrero del Ministerio de Agricultura. Programa para la Innovación y Competitividad del Agro Peruano (IN-CAGRO) y a Gretty Villena Chávez e Ilanit Samolski Klein por su colaboración para la publicación.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Rol de los autores / Authors Roles:

NGM: realizó el diseño experimental, redacción, interpretación de resultados y corrección; SVR: realizó los ensayos experimentales, proceso los datos; BRL: analizó los resultados estadísticos e interpretación.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Financiado por el Programa para la Innovación y Competitividad del Agro Peruano. Fondo para el desarrollo de Servicios Estratégicos N° 2008-00006-AG-IN-CAGRO/FDSE.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran no haber incurrido en aspectos antiéticos. Se solicitó permiso de colecta al presidente de la comunidad de Puerto Bermúdez- Oxapampa y dueños de los huertos.