



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y ORGANOLÉPTICA DE
VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks) BENEFICIADA
ARTESANALMENTE**

DANIELA LÓPEZ LÓPEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis, titulada: **CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y ORGANOLÉPTICA DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks) BENEFICIADA ARTESANALMENTE**, realizada por la alumna: **Daniela López López**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

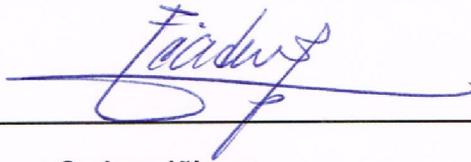
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



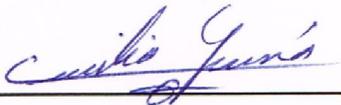
Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza

ASESOR:



Dr. Jorge Cadena Iñiguez

ASESOR:



M.C. Cecilia García Osorio

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio del 2013.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y ORGANOLÉPTICA DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks) BENEFICIADA ARTESANALMENTE

Daniela López López, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013.

RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) es un recurso fitogenético originario de México, el fruto llamado vaina, tiene que ser beneficiado para ser consumido. En este trabajo se evaluó la calidad microbiológica de la vainilla por la presencia de enterobacterias, coliformes totales, mohos y levaduras, así como la cantidad de compuestos fenólicos por técnicas de HPLC (ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico y vainillina) durante el proceso de beneficio artesanal a fin de establecer puntos críticos de control. Se tomaron catorce muestras en diversas etapas del proceso desde la recepción, matado, ciclos de secado al sol alternados con sudor, oreado, depósito provisional y revisiones fitosanitarias, hasta vainilla beneficiada. Los resultados mostraron que existe alta carga microbiana al inicio del proceso el cual fue disminuyendo en el transcurso del beneficio. En la vainilla beneficiada se detectaron bacterias mesófilas aerobias (2.7×10^6 UFC g⁻¹) por lo que no se cumple con la norma mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009, siendo las etapas críticas del proceso, el matado y depósito provisional. La concentración de compuestos fenólicos en la vainilla beneficiada fue diferencial, registrando contenidos de ácido 4-hidroxibenzóico de 0.006%; de 4-hidroxibenzaldehído 0.007%, de ácido vainillínico 0.057% y vainillina 0.92%.

Palabras clave: vainillina, calidad microbiológica, compuestos fenólicos, curado.

**MICROBIOLOGY AND ORGANOLEPTIC QUALITY OF TRADITIONALLY CURED
VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks)**

Daniela López López, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013.

ABSTRACT

Vanilla planifolia Jacks) is an important species originated from Mexico, the fruit called “bean” have to be cured in order to be consumed. In this work it was evaluated the microbiological quality of the bean through the total count of enterobacteria, total coliforms, molds and yeasts during the cured process. Also it was evaluate the development of phenolic compounds by HPLC techniques for 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin and vanillic acid. Fourteen samples were taken at various stages of the cured process from receipt, killed, sun drying cycles alternating with sweating, draining and temporary storage up to final product as cured vanilla. The results shown high initial microbiological account with constant reduction through the cured process, for instance the count of aerobic mesophilic bacteria was 2.7×10^6 CFU g⁻¹ that does not meet the Mexican standard NMX-FF-074-SCFI-2009. The critical stages of the process are killed and temporary storage. Phenolic compounds in the cured vainilla had significant difference in content: 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzaldehyde 0.006% and 0.007 %; vanillic acid and vanillin of 0.057 % and 0.920 % respectively.

Key words: vainillin, microbiological quality, phenolic compounds, cured.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mis amigos porque son imprescindibles en mi vida.

A todas las personas que han contribuido a mi fortalecimiento personal y profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme culminar este trabajo de investigación.

Al **Colegio de Postgraduados** por terminar el nivel de estudio de maestría.

A la **Línea Prioritaria de Investigación en Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad (LPI-7)** y al **Fideicomiso del Colegio de Postgraduados** por el apoyo económico para la realización de este trabajo de investigación.

A la **Dra. Ma. de Lourdes Arévalo Galarza**, por su apoyo incondicional en la dirección y desarrollo de este trabajo de investigación, al **Dr. Jorge Cadena Iñiguez** por su ayuda en la revisión y sus comentarios precisos, la **M.C. Cecilia García Osorio** por sus valiosos comentarios en la revisión de este trabajo, al **Dr. Delfino Reyes López** por sus correcciones precisas y su valiosa ayuda en este trabajo de investigación.

Al maestro beneficiador **Sr. Beremundo Rodríguez** y al **Beneficio “La Alternativa”**, del Ejido Primero de Mayo, Papantla, Veracruz, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

Al **Dr. Gabriel Leyva Ruelas** del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo, así como al **Dr. Marcos Soto Hernández** del Colegio de Postgraduados por su valiosa ayuda y las facilidades otorgadas en los laboratorios para la realización de este trabajo.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS.....	2
2.1	Generales.....	2
2.2	Particulares	2
III.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.1	Historia y generalidades de la vainilla	3
3.2	Importancia mundial y nacional.....	7
3.3	Calidad microbiológica	11
3.4	Importancia calidad organoléptica.....	14
3.4.1	Ruta metabólica de compuestos fenólicos	16
3.4.2	Usos de los compuestos fenólicos.....	21
3.4.3	Proceso de beneficiado artesanal de vainilla.....	22
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1	Localización del sitio de estudio	26
4.2	Análisis Microbiológico	26
4.2.1	Análisis microbiológico durante el proceso de beneficiado.....	26
4.2.2	Análisis microbiológico de la vainilla beneficiada.....	28
4.2.3	Análisis microbiológico de esporulación de hongos.....	32
4.3	Análisis de Compuestos Fenólicos	33
4.3.1	Extracción	33
4.3.2	Análisis de compuestos fenólicos en el HPLC.....	35
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1	Análisis Microbiológico	39
5.1.1	Análisis microbiológico durante el proceso de beneficiado.....	39
5.1.2	Análisis microbiológico de la vainilla beneficiada.....	45
5.1.3	Análisis microbiológico de esporulación de hongos.....	48
5.2	Análisis de Compuestos Fenólicos	49
5.2.1	Análisis de compuestos fenólicos en el HPLC.....	49

VI. CONCLUSIONES.....	67
VII. RECOMENDACIONES	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXO A.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Especificaciones microbiológicas para vainilla.....	13
Cuadro 2. Especificaciones de contenido de vainillina por grado de calidad de vainilla.....	15
Cuadro 3. Composición química de la vainilla.....	16
Cuadro 4. Desarrollo de compuestos fenólicos en el beneficiado artesanal de vainilla.....	61
Cuadro 5. Cocientes de compuestos fenólicos en muestras de vainilla del proceso de beneficiado artesanal.....	62
Cuadro 6. Cocientes de compuestos fenólicos en vainilla beneficiada.....	63

Lista de Figuras

Figura 1. Planta de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks).....	4
Figura 2. Silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks).....	6
Figura 3. Volumen y valor de las exportaciones de vainilla en 2009.	7
Figura 4. Superficie sembrada y cosechada y volumen de producción de vainilla en México durante el periodo 2000-2010.	8
Figura 5. Estados productores de vainilla en el año 2010 en México.....	9
Figura 6. Superficie sembrada y cosechada de vainilla en los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla e Hidalgo en el año 2010.	9
Figura 7. Rendimiento, valor de la producción y precio medio rural de vainilla para México en el periodo 2000-2010.	10
Figura 8. Rendimiento, valor de la producción y precio medio rural de vainilla en los estados productores de México para el año 2010.	11
Figura 9. Propuesta de la ruta de la biosíntesis de la vainillina mostrando las rutas metabólicas del ferulato y benzoato (Havkin-Frenkel <i>et al.</i> , 2007).	17
Figura 10. Ruta metabólica biosintética propuesta de vainillina en <i>Vanilla planifolia</i> Jacks (Havkin-Frenkel <i>et al.</i> , 2007).	18
Figura 11. Compuestos principales de la vainilla.	21
Figura 12. Proceso de beneficiado artesanal de la vainilla en Papantla, Veracruz, México.	25
Figura 13. Muestreo del proceso de beneficiado artesanal de vainilla.	27
Figura 14. Cajas Petri con cultivo ASB.....	31
Figura 15. Curvas de calibración para los principales compuestos: (a) ácido 4-hidroxibenzóico; (b) 4-hidroxibenzaldehído; (c) ácido vainillínico; (d) vainillina)....	37
Figura 16. Cromatograma de una mezcla de los cuatro principales compuestos fenólicos en silicuas de vainilla.....	38
Figura 17. Recuento total promedio de enterobacterias, coliformes totales y mohos-levaduras.....	39
Figura 18. Carga microbiana de enterobacterias en Recepción y Revisión No.2..	42
Figura 19.Carga microbiana de coliformes totales en Recepción y Revisión No.2.	42
Figura 20. Carga microbiana de mohos y levaduras en Recepción y Revisión no.2.	44
Figura 21. Bacterias mesófilas aerobias en vainilla beneficiada.	46
Figura 22. Prueba negativa de coliformes totales en vainilla beneficiada.	47
Figura 23. Prueba negativa de mohos y levaduras en vainilla beneficiada.	47
Figura 24. Prueba negativa de Salmonella en vainilla beneficiada.	48
Figura 25. Prueba negativa de esporulación de hongos.	49
Figura 26. Recepción de silicuas verdes de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks).....	50

Figura 27. Silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks) un día después del matado.	51
Figura 28. Desarrollo del ácido-4-hidroxibenzóico durante cada etapa el proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).....	52
Figura 29. Secado y sudado de silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks).....	53
Figura 30. Desarrollo del 4-hidroxibenzaldehído durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).....	53
Figura 31. Silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks) blanda durante el proceso de beneficiado.....	54
Figura 32. Silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks) entreseca durante el proceso de beneficiado.	55
Figura 33. Revisión y clasificación de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks) beneficiada.	55
Figura 34. Desarrollo del ácido vainillínico durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).....	56
Figura 35. Desarrollo de la vainillina durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).....	57
Figura 36. Depósito provisional de silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks). ...	58
Figura 37. Desarrollo de compuestos fenólicos y microorganismos durante el proceso de beneficiado de vainilla.	59
Figura 38. Desarrollo de compuestos fenólicos durante el proceso de beneficiado.	60
Figura 39. Silicuas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks) beneficiada.	65
Figura 40. Comparación de compuestos fenólicos de vainilla beneficiada (revisión 3 al final del proceso), 7 meses y 2 años de almacenamiento.	66

I. INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) es un recurso fitogenético mesoamericano de amplia demanda a nivel mundial. En México la producción se ha mantenido estancada debido a que la industria enfrenta diferentes problemas tales como: falta de organización de productores, aborto de fruto y baja calidad del producto entre otros. El fruto de *Vanilla planifolia* se cosecha en madurez fisiológica y se somete al proceso de beneficiado, que generalmente es artesanal. En este caso, las operaciones que comprenden el secado al sol y sudado son cíclicas y escalonadas, cuyos tiempos dependen solo del conocimiento empírico del maestro beneficiador. Por lo anterior, se desconocen los cambios bioquímicos que se llevan a cabo durante cada etapa del proceso, además por realizar el proceso al sol e intemperie, se desconoce la calidad microbiológica del producto, que durante un almacenamiento prolongado puede presentar el desarrollo de mohos, levaduras e incluso bacterias no satisfaciendo las características de calidad expresadas en la Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009, y que no es contemplada por los productores-beneficiadores de la vainilla.

El presente trabajo tuvo por objetivo realizar la evaluación del contenido de compuestos fenólicos más importantes durante cada etapa del proceso de beneficiado de la vainilla para determinar la eficiencia del sistema tradicional artesanal, además de realizar el análisis de la calidad microbiológica durante dicho proceso. Los resultados de esta investigación contribuirán a tener un diagnóstico de la situación actual y una base para mejorar los eslabones del beneficiado de vainilla en forma artesanal y reducir la carga microbiana de la vainilla.

II. OBJETIVOS

2.1 Generales

Caracterizar el desarrollo de los compuestos fenólicos y la calidad microbiológica durante cada etapa del proceso de beneficiado de la vainilla.

2.2 Particulares

- i. Determinar puntos críticos de control y evaluar la calidad microbiológica (cuenta total microbiana, coliformes totales, hongos, levaduras y presencia de salmonella) en cada etapa del proceso y producto final, que señalen deficiencias de control en el sistema tradicional, para garantizar el cumplimiento de normas Internacionales.
- ii. Determinar mediante cromatografía líquida de alto espectro (HPLC) el desarrollo de los compuestos fenólicos característicos de la vainilla (vainillina (4-hidroxí-3-metoxibenzaldehído), ácido vainillínico (ácido 4-hidroxí-3-metoxibenzóico), ácido 4-hidroxibenzóico y 4-hidroxibenzaldehído), en cada etapa del proceso de beneficiado y determinar la importancia de la repetición de cada fase en la calidad final del producto.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Historia y generalidades de la vainilla

La vainilla es una especie originaria de México y Centroamérica, distribuida desde los bosques tropicales del sureste de México, hasta Costa Rica y el este de la India (Schlüter *et al.*, 2007; Lubinsky *et al.*, 2008).

Los primeros registros de la vainilla datan de los años 1427 a 1440, periodo en el que los aztecas conquistaron el imperio totonaca y la recibían como tributo. El nombre náhuatl de la vainilla es “tlil-xochitl”, que significa flor negra. Los aztecas la usaban como aromatizante del chocolate, bebida demandada por la nobleza azteca (ASERCA, 2002).

La vainilla era conocida por diferentes nombres como “caxixanath” ó “xanath” en totonaco y “sisbic” en maya (Hernández *et al.*, 2010). Posteriormente los españoles le llamaron vainilla, que es un diminutivo de vaina, aunque el fruto es botánicamente una silicua. La vainilla es una planta trepadora del género *Vanilla* Plumier ex Miller, subfamilia Vanilloideae, perteneciente a la familia más numerosa del reino vegetal, Orquidaceae, con más de 20,000 especies distribuidas en los países cálidos y templados del mundo. Según las estimaciones moleculares la vainilla data de alrededor de 65 millones de años (Figura 1) (Font Quer, 1980, Reyes *et al.*, 2008; Lubinsky *et al.*, 2008).



Figura 1. Planta de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks).

La vainilla es una planta herbácea epífita, perenne, tiene tallo cilíndrico poco ramificado, largo, flexible, succulento, color verde; produce hojas opuestas alternas subsésiles, de forma oblonga-elíptica lanceolada, ápice agudo acuminado (bordes con el mismo ángulo y acabado en punta), de 10 a 20 cm de longitud, 4 a 8 cm de ancho y 1 a 2 mm de espesor. Su consistencia es carnosa y superficie lustrosa cutinizada, principalmente en el haz. Desarrolla en los nudos, y en forma opuesta a las hojas un par de raíces adventicias botánicamente son zarcillos radicales, con las cuales se adhiere a los árboles u otro tipo de soporte, (Font Quer, 2001; Reyes *et al.*, 2008).

Las inflorescencias se producen en racimos axilares de diez a veinte flores colocadas en espiral. La flor está compuesta por tres sépalos, tres pétalos, dos normales y uno modificado, de color amarillo a verde pálido y una columna central formada por el estambre y el pistilo soldados, envueltos por el labelo que es un pétalo medio, superior, generalmente de tamaño, forma y color muy distintos de los correspondientes a los dos pétalos laterales. Existe también una pieza floral denominada rostelo, un órgano constituido por una masa de tejido generalmente un poco prolongada a modo de piquito y correspondiente al estigma impar anterior, estéril (que pasa a ser posterior por torsión del ovario), que se interpone entre los sacos de polen y el estigma limitando la polinización. El ovario es tricarpelar y el fruto es una silicua semejante a una vaina carnosa, dehiscente, de sección transversal ligeramente triangular, de 15 cm aproximadamente de longitud, con miles de semillas muy pequeñas, de color oscuro, globosas con la testa sólida. Las raíces se desarrollan sin profundidad en el suelo extendiéndose superficialmente a varios metros de distancia (Font Quer, 2001; Reyes *et al.*, 2008).

Se reportan 110 especies descritas del género ***Vanilla*** Plumer ex Miller, 35 de las cuales producen frutos aromáticos, entre las que destacan *V. planifolia* y *V. tahitensis* especies de importancia comercial (Figura 2) (Soto, 2003; 2006; Lubinsky *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2010; Tapia-Ochoategui *et al.*, 2011).



Figura 2. Silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks).

Los requerimientos agroecológicos de *Vanilla planifolia* son clima cálido húmedo y subhúmedo, temperatura de 21 a 27 °C e incluso hasta 32 °C, y las temperaturas menores a 7 °C provocan daños por quemaduras. Puesto que es una planta suculenta la humedad ambiental debe ser 80 % con buena ventilación para evitar daños por enfermedades. Se requiere una precipitación media anual de 1500 mm o más, distribuida en el año, excepto en el periodo de polinización, así como de dos a tres meses relativamente secos, para estimular la floración (Hernández *et al.*, 2010). La altitud favorable se encuentra entre 0 m y 600 m, aunque se han encontrado plantas en altitudes de 1100 m en México (Soto, 2003) y 1500 m en India (Anandaraj *et al.*, 2005).

En el caso de luz-sombra, la vainilla requiere alrededor del 50% de luz o sombra en la mayor parte del año, recomendando 70% en meses de sequía y de 30 a 50% en los meses más lluviosos. El tipo de suelo debe tener excelente drenaje, una capa de 15 a 20 cm de cobertura vegetal y pH entre 6 y 7.

3.2 Importancia mundial y nacional

La superficie cosechada de vainilla creció 90.4% en el periodo del 2000 al 2010 a nivel mundial, pasando de 38,000 a 72,400 ha. Los principales países por superficie cosechada (miles de ha) son: Madagascar (60.1), Indonesia (8.5), China (1.2) y México (0.9) en 2010 con una producción total de 6,700 t. Sin embargo el rendimiento ha tenido un decremento del 11.9% pasando de 0.1 t ha⁻¹ en el 2000 a 0.09 t ha⁻¹ en 2010. Los países con mayor rendimiento fueron China (1.1), Tonga (0.7) y México (0.4) para el 2010. Es interesante notar que países con mayor superficie cosechada como Madagascar e Indonesia no se encuentran dentro de los de mejor rendimiento. El volumen de las exportaciones de vainilla ha manifestado un crecimiento del 75.8 % con 3.3 mil t en 2000 a 5.8 mil t en 2009, y el valor de las exportaciones se ha incrementado de 48.8 %, de 81.5 millones de dólares en 2000 a 121.2 millones de dólares en 2009 (Figura 3).



Figura 3. Volumen y valor de las exportaciones de vainilla en 2009.

Fuente: Elaboración propia con datos de FAOSTAT 2011.

En cuanto a las exportaciones, México ocupa el lugar 21 con 24 t y valor de 0.4 millones de dólares (Figura 3), que representa el 1 % de la producción de Madagascar; aun cuando Francia, Canadá y Alemania no son productores, se ubican entre los principales exportadores por ser grandes acopiadores.

La situación nacional ha variado en los últimos años, la superficie sembrada ha disminuido 32.5% pasando de 2.0 a 1.3 miles ha entre el 2000 y 2010 (Figura 4), y los principales estados productores son Veracruz, Oaxaca, Puebla e Hidalgo con el 99% de la superficie cosechada, con volumen de 395 t para 2010 (Figuras 5 y 6).

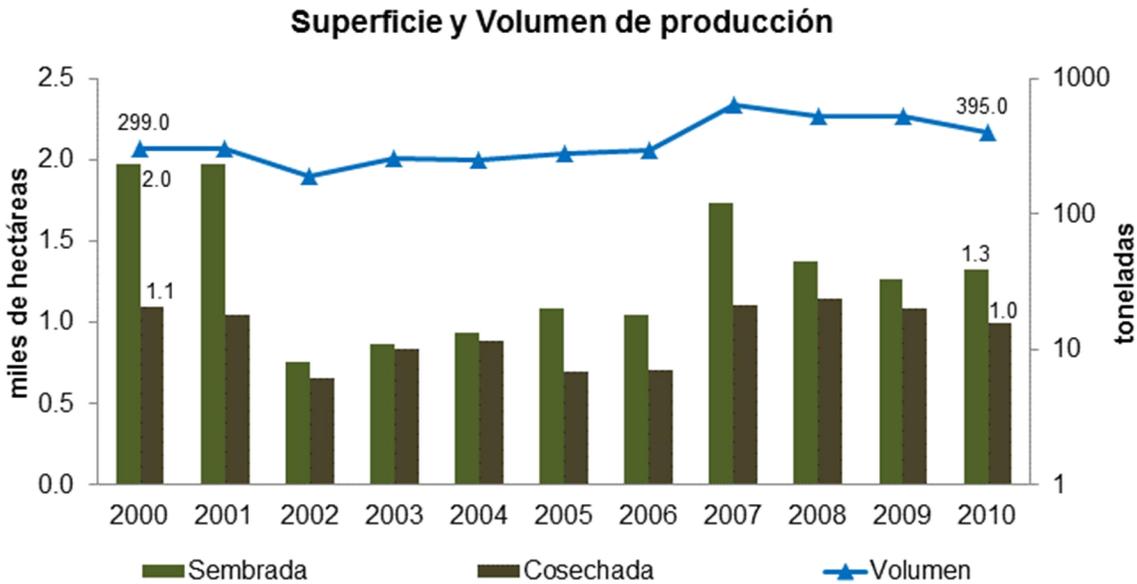


Figura 4. Superficie sembrada y cosechada y volumen de producción de vainilla en México durante el periodo 2000-2010.

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP-SIACON 2011.

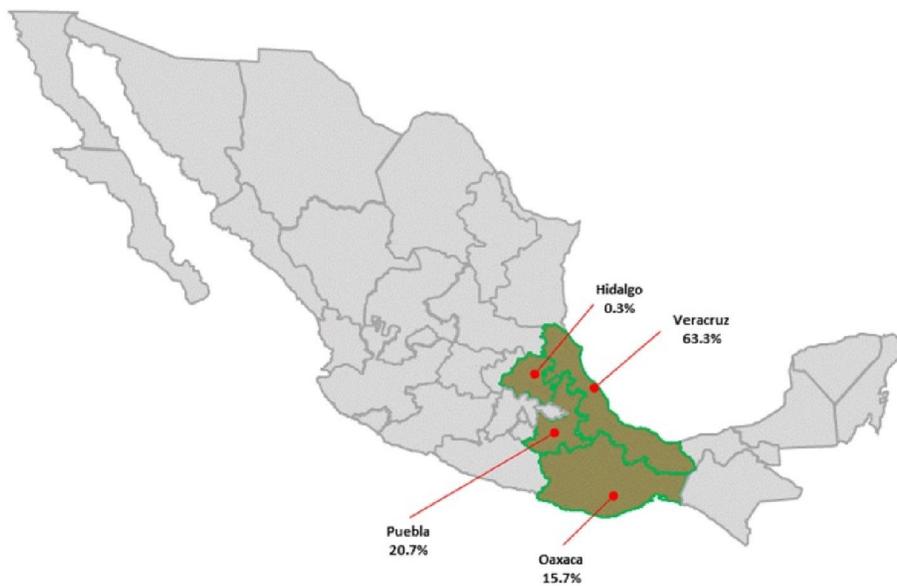


Figura 5. Estados productores de vainilla en el año 2010 en México.

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP-SIACON 2011.

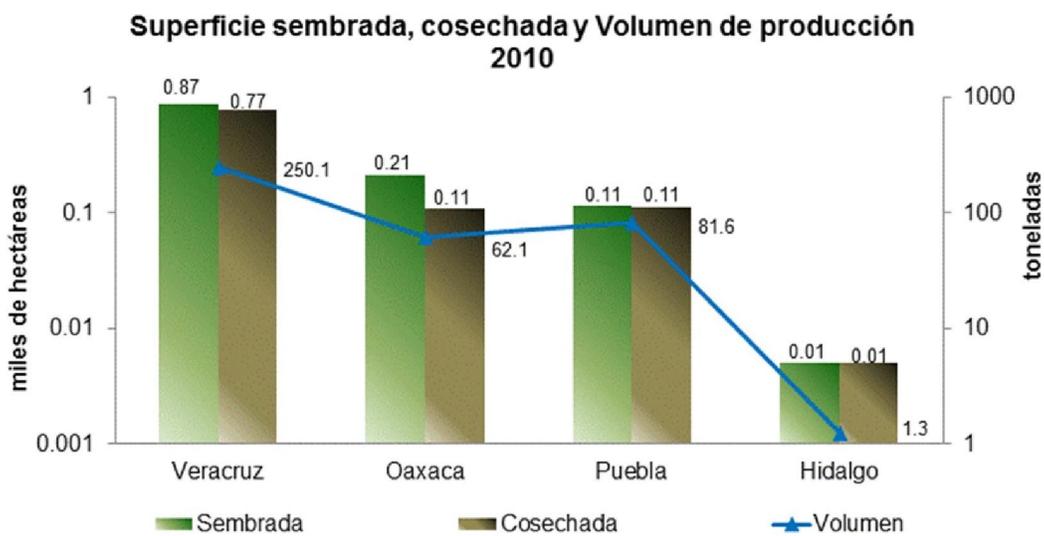


Figura 6. Superficie sembrada y cosechada de vainilla en los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla e Hidalgo en el año 2010.

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP-SIACON 2011.

El rendimiento de la producción es de 0.4 t ha⁻¹ en 2010, Puebla tuvo un rendimiento de 0.7 t ha⁻¹, e Hidalgo 0.3 t ha⁻¹. El valor de la producción tuvo un crecimiento del 22.8%, aumentando de 15.0 a 18.4 millones de pesos del año 2000 al 2010. El precio medio rural disminuyó en 7.1%, de 50.1 a 47.0 mil pesos por tonelada del año 2000 al 2010. El estado que tuvo el mejor precio (en miles de pesos por tonelada) en 2010 fue Puebla (79.7), seguido por los estados de Oaxaca (52.1), Veracruz (34.4.) e Hidalgo (22.0) (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Rendimiento, valor de la producción y precio medio rural de vainilla para México en el periodo 2000-2010.

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP-SIACON, 2011.

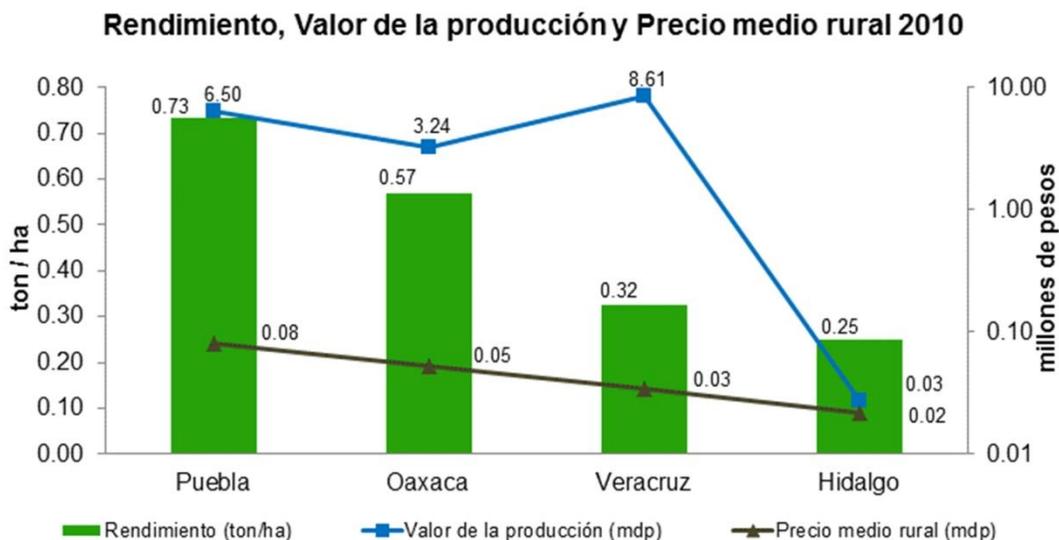


Figura 8. Rendimiento, valor de la producción y precio medio rural de vainilla en los estados productores de México para el año 2010.

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP-SIACON, 2011.

De acuerdo a datos de la Secretaría de Economía (2011), México exportó 53 t (569 mil US), de los cuales 92 % se destinan a Estados Unidos y el resto a Alemania y Canadá. En general la producción de vainilla en México ha tenido diversos problemas entre los que destacan el abandono de las plantaciones, incidencia de plagas y enfermedades, aborto y caída del fruto y baja calidad de la vainilla beneficiada.

3.3 Calidad microbiológica

Recientemente la calidad microbiológica ha cobrado importancia debido a los riesgos de transmisión de enfermedades por alimentos (ETA's). Las ETA's se producen cuando el alimento se contamina con patógenos o sus toxinas (bacterias, parásitos, virus, etcétera), los cuales llegan a los alimentos por contaminación a través de superficies sucias, procesos inadecuados de

elaboración, uso de materias primas contaminadas o falta de limpieza e higiene del personal. Los peligros biológicos pueden ocasionar infecciones bacterianas o virales, infestaciones parasitarias o por huevecillos e intoxicaciones (Paredes, 2007). En el caso de la vainilla, al final del proceso de beneficiado, su humedad se ubica entre el 25 y 30%, conservándose en cartones o en cajones de madera para su acondicionamiento (3-6 meses) y posterior almacenamiento. Estas condiciones pueden conducir al crecimiento de hongos como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., en las silicuas, representando un riesgo potencial al consumidor (Thomas y Bindumol, 2005).

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009 la vainilla debe estar limpia, presentar olor, color y sabor característicos; estar libre de materia extraña, de plagas o de daños por éstas, incluyendo señales de enfermedades. Debe tener aroma característico: dulce y exenta de olores asociados a la pudrición. Sin embargo, no existen reportes sobre un análisis del producto final ni del proceso, los cuales en este caso de ser necesarios, los realiza el cliente, lo cual repercute negativamente ya que existe el riesgo de que se rechace el producto (Cuadro 1). De tal forma, que es conveniente detectar los puntos críticos de control (PCP) que reduzcan al máximo el riesgo por contaminación, para garantizar una calidad del producto.

Cuadro 1. Especificaciones microbiológicas para vainilla.

Especificación	Métodos de Prueba	Límite permitido
Bacterias mesofílicas aerobias UFC/g	NOM-092-SSA1-1994	100 UFC/g máximo
Mohos y levaduras UFC/g	NOM-111-SSA1-1994	10 UFC/g máximo
Coliformes totales en placa UFC/g	NOM-113-SSA1-1994	Negativo
Salmonella	NOM-114-SSA1-1994	Negativo en 25 g de muestra

Durante el proceso de beneficiado artesanal de vainilla se pueden presentar problemas al manejar grandes volúmenes debido a la contaminación microbiana, principalmente de mohos y levaduras, por ejemplo en un lote de treinta toneladas de vainilla pueden llegar a perderse hasta trescientos kilogramos (Comunicación personal, Rodríguez, 2011). Dentro de los principales grupos de microorganismos que pueden estar presentes en la vainilla se ubican a las bacterias mesófilas aerobias las cuales crecen a temperaturas entre 20 a 45 °C y dependen del oxígeno atmosférico para crecer. Dentro de este grupo se encuentran especies como *Bacillus psychrophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rhodospirillum rubrum* y *Anabaena variabilis* (Prescott et al., 2002).

También se encuentran enterobacterias, que agrupa a los géneros *Escherichia* spp., *Aerobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Paracolobactrum* spp., *Erwinia* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Estas son bacterias bacilares, no esporógenas, gram-negativas, crecen bien en medios de cultivo artificiales. Los cuatro primeros géneros son saprofitos importantes en bacteriología de los alimentos y los tres últimos los constituyen principalmente

gérmenes patógenos (Frazier, 1976). Otros géneros que pertenecen también a enterobacterias son *Enterobacte* spp. y *Yersinia* spp. (Prescott *et al.*, 2002). Las especies principales son *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* y *Paracolobactrum* spp. Los coliformes son bacilos cortos, aerobios y anaerobios facultativos, gram-negativos, que no forman esporas y fermentan la lactosa con formación de gas. Dentro de este grupo se encuentran los coliformes fecales que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y provocan enfermedades gastrointestinales (Prescott *et al.*, 2002; Frazier, 1976).

Dentro del género *Salmonella* spp. especies como *Salmonella enteritidis* son bacterias entéricas patógenas, que al desarrollarse en los alimentos, ocasionan intoxicaciones alimenticias (Frazier, 1976).

Los mohos y levaduras, agrupan a los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. que producen micotoxinas y se han encontrado en vainilla. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos bajo condiciones específicas fisiológicas (crecimiento microbiano) y ambientales (pH, temperatura, actividad de agua). En este sentido la toxicidad fúngica puede ser eliminada durante el proceso de beneficiado, mientras que las micotoxinas permanecen en el alimento (Odoux y Grisoni, 2011).

3.4 Importancia calidad organoléptica

El valor de la vainilla radica en sus características organolépticas, puesto que se utiliza en la industria alimenticia, perfumería y farmacéutica. Aunque se han encontrado más de 250 diferentes compuestos que confieren a la vainilla sus características, los compuestos principales son el 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vainillínico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) y vainillina (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2006; Havkin-Frenkel *et al.*, 2007; Kishor *et al.*, 2010). Dependiendo de las condiciones de la variedad, cultivo, condiciones

de crecimiento, beneficiado y almacenamiento, la concentración de los compuestos químicos en la vainilla será variable, sin embargo lo que determinará su calidad final y precio en el mercado será principalmente el contenido de vainillina.

En la silicua verde de la vainilla los compuestos más importantes del aroma se encuentran como glucósidos, pero durante el proceso de “curado” las condiciones de temperatura, humedad, luminosidad, etc., promueven la liberación de agliconas dejando libres los compuestos aromáticos (Voisne *et al.*, 1995). Las reacciones que se llevan a cabo durante el curado se desconocen, pero aparentemente un complejo enzimático entre las que destaca la β -glucosidasa, fundamental en la formación del sabor (Digdum *et al.*, 2002). Por ejemplo, estudios realizados durante el desarrollo de silicua verde a silicua madura muestran diferencias significativas en los niveles de glucovainillina, vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído glucósido, *p*-hidroxibenzaldehído y sacarosa entre otros (Palamas *et al.*, 2009). La Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009 establece las especificaciones que determinan la calidad de vainilla, las cuales se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Especificaciones de contenido de vainillina por grado de calidad de vainilla.

Especificación	Grado de calidad					
	Extra	Categoría I		Categoría II		Categoría III
		Gourmet	Ordinaria	Gourmet	Ordinaria	Ordinaria
Vainillina (%)	2.0-2.4	2.0-2.4	1.6-2.0	2.0-2.4	1.6-2.0	1.6

La misma Norma Mexicana (NMX-FF-074-SCFI-2009) establece la importancia de analizar el contenido de otros compuestos fenólicos importantes,

tales como, el ácido vainillínico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzóico (Cuadro 3). Autores como Dignum *et al.* (2002), mencionan que bajo condiciones de curado en el laboratorio, la glucovainillina y el ácido glucovainillínico son hidrolizados a vainillina y ácido vainillínico, respectivamente, relacionando estos procesos con la activación e inactivación de enzimas específicas como la β -glucosidasa, peroxidasa y proteasas. Sin embargo, no existen estudios que muestren la relación entre las etapas del proceso de beneficio y la cantidad de estos compuestos en la vainilla beneficiada.

Cuadro 3. Composición química de la vainilla.

Componente	g/kg vaina
Vainillina	20
ácido vainillínico	1
p-hidroxibenzaldehído	2
ácido p-hidroxibenzóico	0.2
Azúcares	250
Lípidos	150
Celulosa	150-300
Minerales	60
Agua	350

Fuente: De la Cruz *et al.*, 2009.

3.4.1 Ruta metabólica de compuestos fenólicos

El sabor característico de la vainilla se desarrolla durante el beneficiado, siendo la vainillina el compuesto principal y por consiguiente el más estudiado químicamente (Havkin-Frenkel *et al.*, 2007). La vainillina es un producto de la ruta del ácido shikímico, bajo esta ruta la fenilalanina o la tirosina por medio de una

deaminación se transforman a un fenilpropanoide (C6-C3), el cual es un precursor para vainillina (Figuras 9 y 10). Aunque se está de acuerdo en que la vainillina se origina de los compuestos fenilpropanoides (C6-C3), existen dos propuestas relacionadas con la conversión de un precursor fenilpropanoide a vainillina. La primera, propuesta por Zenk (1965) sugiere que el anillo aromático de los compuestos C6-C3 (ácido cinámico-trans, ácido *p*-cumárico) bajo hidroxilación y metilación da lugar al ácido ferúlico, que posteriormente puede sufrir un acortamiento de la cadena a vainillina. A este proceso se le denomina “Ruta metabólica del ferulato”. La segunda propone que el primer evento metabólico es el acortamiento de la cadena de un fenilpropanoide, seguido por la hidroxilación y metilación del anillo aromático para obtener la vainillina. A este proceso se le denomina “Ruta metabólica del benzoato”. También existe la posibilidad de que un primer intermediario en la ruta del ácido shikímico lleve directamente al *pool* de benzoato, *bypasseando* la producción de fenilpropanoides y su degradación a los intermediarios de la ruta metabólica del benzoato.

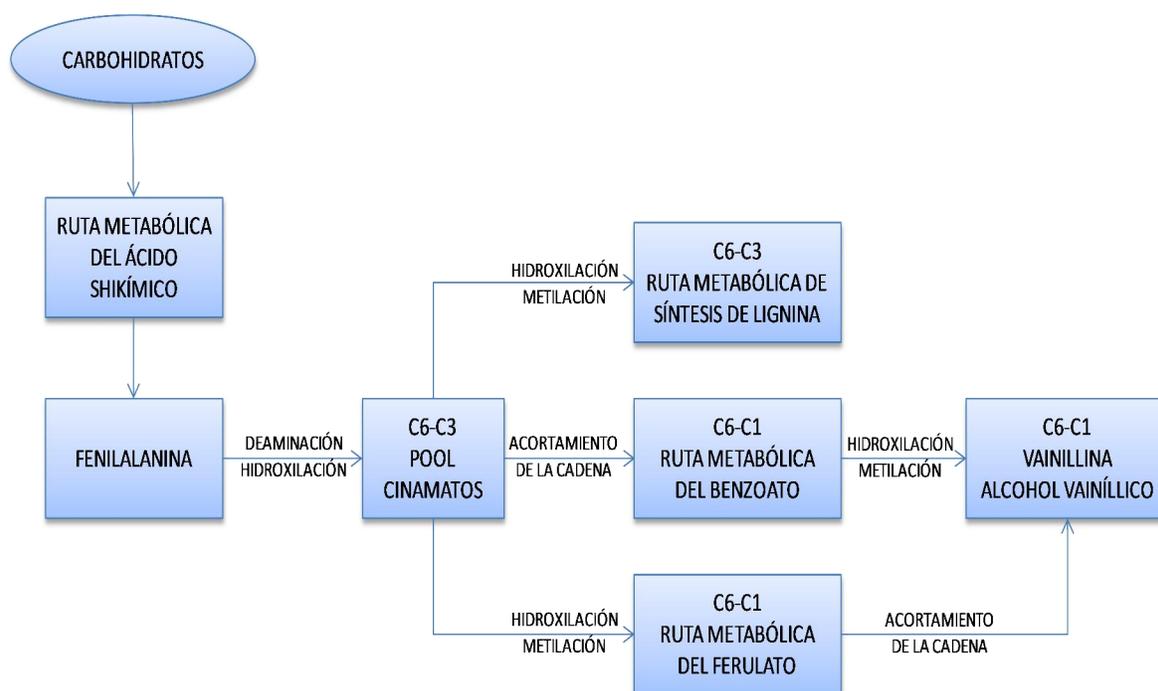


Figura 9. Propuesta de la ruta de la biosíntesis de la vainillina mostrando las rutas metabólicas del ferulato y benzoato (Havkin-Frenkel *et al.*, 2007).

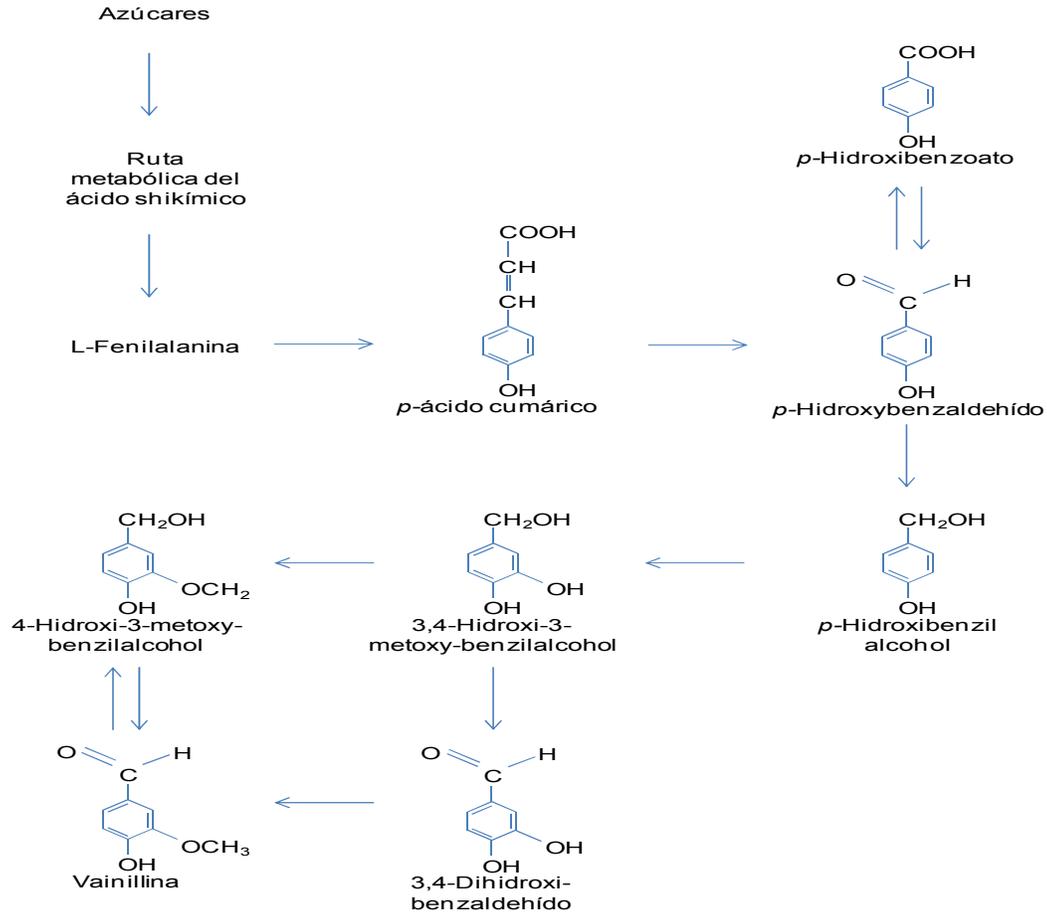


Figura 10. Ruta metabólica biosintética propuesta de vainillina en *Vanilla planifolia* Jacks (Havkin-Frenkel *et al.*, 2007).

La parte del metabolismo secundario que no se ha entendido cabalmente son las reacciones que dan lugar al acortamiento de la cadena de los ácidos hidroxicinámicos para obtener los ácidos benzóicos sustituidos. Así pues, en las plantas puede haber por lo menos 5 diferentes rutas hacia los ácidos benzóicos:

1. Biosíntesis de vainillina en *V. planifolia*. Conversión de ácidos hidroxicinámicos a sus ésteres de Coenzima-A. El acortamiento de la cadena ocurre en una manera similar a la β -oxidación dependiente del NAD de los ácidos grasos, llevando al ácido benzoico.

2. Ruta metabólica no oxidativa para la conversión del ácido 4-cumárico a 4-hidroxibenzaldehído, sin requerir un cofactor. El ácido 4-hidroxibenzóico se forma a partir de 4-hidroxibenzaldehído mediante una dehidrogenasa separada dependiente del NAD.
3. Ruta metabólica a vainillina en cultivo de células *V. planifolia* que involucra la metilación de la posición 4 de los ácidos hidroxicinámicos, seguido de una glucosilación, acortamiento de la cadena y 4-demetilación.
4. Ruta metabólica del shikimato. En xantonas de *Centaureum erythraea* los precursores del ácido benzoico se originan directamente de la ruta metabólica del shikimato más que de la ruta metabólica del ácido cinámico.
5. Ruta biosintética de vainillina en bacterias *Pseudomonas fluorescens*. La vainillina se produce de forma no oxidativa de feruloyl CoA por una enzima de la familia enoyl-SCoA hidratasa/isomerasa. En la expresión de enzimas de *Pseudomonas* en tabaco se observó una acumulación de glucósidos de ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vainillínico, 4-hidroxibenzilalcohol y alcohol vainillínico pero no vainillina.
6. Ruta metabólica del shikimato vía ácido isocorísmico. Algunos derivados del ácido benzóico (ácido salicílico y ácido 2,3-dihidroxibenzóico) pueden ser sintetizados por esta vía, la cual no involucra a la fenilalanina como intermediario.

Havkin-Frenkel *et al.* (2007), concluyen que la ruta metabólica que lleva a la formación de vainillina es la del acortamiento de la cadena de manera no oxidativa del ácido *p*-cumárico hacia *p*-hidroxibenzaldehído, lo cual se observó tanto en cultivo *in vitro* de células en donde se acumuló ácido *p*-cumárico, 4-hidroxibenzaldehído, alcohol 4-hidroxibenzil, 3,4-dihidroxibenzaldehído, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibenzil y vainillina.

En cuanto al sitio de producción de la vainillina, el tejido blanco parenquimático de la silicua contiene los compuestos intermediarios en forma glicosilada, como el ácido vainillínico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-

hidroxibenzóico. Estos compuestos se encuentran tanto en la placenta como en las células parenquimáticas adyacentes al endocarpio, así como en la matriz densa secretada, mostrando un gradiente descendente del endocarpio hacia el exterior de la cavidad del fruto, iniciando la acumulación de vainillina después de 3 a 4 meses de desarrollo del fruto. El paso enzimático final en la biosíntesis del compuesto de sabor vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es por metilación de 3,4-dihidroxibenzaldehído. Las O-metiltransferasas vegetales (OMTs) que usan S-adenosimetionina (SAM) como donador metil están involucradas en la síntesis de un rango diverso de productos secundarios. Actualmente se encuentra en proceso experimental la participación de esta enzima en la formación de vainillina ya que esto puede identificar el paso final en la ruta metabólica biosintética de la vainillina, antes a la etapa final de la glicosilación de vainillina y almacenamiento. Además, la glicosilación de la vainillina en la vainilla es el paso posterior en la biosíntesis de vainillina y su almacenamiento en los tejidos. La mayoría de los metabolitos secundarios en las plantas, son O, N o S unidos a uno o más azúcares. Los compuestos aromáticos, tal como fenilpropanoides, quinonas y flavonoides, entre otros, pueden ser glicosilados. La glicosilación realza la hidrofilia de moléculas aceptoras, incluyendo metabolitos secundarios y altera sus propiedades químicas, bioactividad y localización subcelular. La glicosilación involucra la regulación de la percepción del sabor y las propiedades organolépticas de los compuestos del sabor de las plantas. En consecuencia, la glicosilación de vainillina a glucovainillina altera la percepción del sabor del compuesto, por analogía a otras instancias donde la glicosilación altera las propiedades organolépticas de los compuestos naturales (Havkin-Frenkel *et al.*, 2007).

La hidrólisis de glucovainillina, requerida para liberar la vainillina en la forma libre y desarrollar el sabor del compuesto es un paso fundamental durante el beneficiado. La vainillina es poco soluble en agua y tiende a volatilizarse en soluciones acuosas, por lo que el aumento de la hidrofilia al formarse glucovainillina, aumenta su solubilidad en agua y su acumulación en la silicua. La

glicosilación también ayuda a disminuir la tendencia del compuesto a volatilizarse. Esto explica, la acumulación de intermediarios en la ruta metabólica biosintética en la etapa glicosilada.

3.4.2 Usos de los compuestos fenólicos

A los compuestos fenólicos como el ácido-4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico y vainillina (Figura 11), se les atribuyen propiedades fisiológicas y bioquímicas, como los ácidos fenólicos que tienen actividad en la regulación de la germinación de semillas, inhibición de esporas fúngicas y en general del crecimiento vegetal. Además están relacionados con mecanismos de resistencia en plantas contra fitopatógenos, inhibición o activación enzimática.

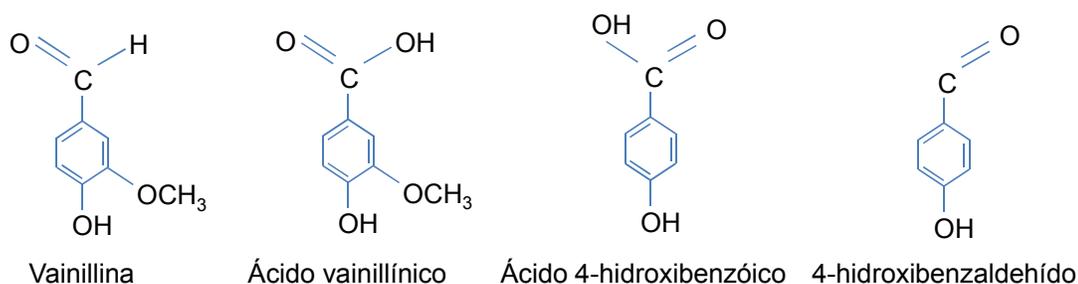


Figura 11. Compuestos principales de la vainilla.

Actualmente la vainilla tiene múltiples usos, se utiliza para intensificar y dar sabor especial a los productos alimenticios (helados, chocolate, panes finos, bebidas gaseosas, pasteles dulces, comidas gourmet, etc.), a los licores y medicamentos, así como fragancia en los perfumes y cosméticos finos. Se le han encontrado propiedades como insecticida, fungicida, anticancerígenos y disfunción sexual, además estimula el apetito de los bebés y animales, y enmascara el mal olor de desechos industriales, entre otros usos (Havkin-Frenkel, 2005; Hernández *et al.*, 2010, Sciubba *et al.*, 2009).

Walton *et al.* (2003), mencionan que el 50 % de la producción mundial de vainillina sintética se usa como intermediario en la industria química y farmacéutica para la producción de herbicidas, agentes antiespumante o drogas tal como papaverina, L-dopa, L-metildopa y el agente antimicrobiano, trimetoprima. También se usa como productos del hogar como ambientadores aromáticos o pulidores de piso. Tal como otros compuestos fenólicos de bajo peso molecular, la vainillina muestra propiedades antioxidantes y antimicrobianas y por lo tanto tiene el potencial para uso como conservador. Jadhav *et al.* (2009), reportan una actividad contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, mohos y levaduras en purés de frutas y en medios de cultivo en laboratorio y tiene un uso potencial como conservador de alimentos.

Para valorar la composición de la vainillina Gassenmeier *et al.* (2008), mencionan que los cocientes de compuestos marcadores como la vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico y ácido-*p*-hidroxibenzóico son usados como parámetros de calidad y más importante como parámetros de autenticidad.

3.4.3 Proceso de beneficiado artesanal de vainilla

A continuación se describe el proceso artesanal del beneficio de vainilla, en el área de Papantla, Veracruz, México (Comunicación personal, Rodríguez, 2010) (Figura 12):

- 1.- Recepción de la materia prima: Después de la cosecha las silicuas verdes son transportadas en sacos al beneficio y separadas por tamaño.
- 2.- Despezonado: Consiste en el desprendimiento del pedúnculo floral.
- 3.- Escaldado o Matado: Las silicuas se sumergen en agua caliente, se tienen varios tratamientos a diferente temperatura, alrededor de 100 °C se sumergen tres cargas de silicuas de aproximadamente 20 kg, por diferente tiempo (1 s, 2 s y 3 s). Posteriormente las silicuas se colocan en cajones, se cubren con manta y se les coloca peso encima. El escaldado o matado del

fruto puede realizarse también en hornos que usan leña como combustible o en hornos eléctricos a 60 °C durante 48 h con la finalidad de detener el desarrollo vegetativo, Odoux y Grisoni (2011) mencionan que el matado reduce además la carga microbiana inicial de las silicuas verdes de vainilla. Odoux *et al.* (2003), mencionan que la hidrólisis de la glucovainillina ocurre en un paso muy posterior a la maduración de la silicua o durante los pasos térmicos iniciales del proceso de curado los cuales involucran secuencias de matado–sudado para prevenir la dehiscencia de la silicua durante el secado. El propósito del curado, iniciando con el matado, es poner en contacto a los precursores del sabor y las enzimas que catalizan la hidrólisis de los compuestos precursores de la vainillina y otros compuestos del sabor (Krishnakumar *et al.*, 2007).

El tratamiento térmico origina la descompartimentación en el simplasma con la ruptura del tonoplasto; lento o rápido mezclando el contenido vacuolar con el citoplasma; modificación de las concentraciones de soluto (electrolitos, sustancias neutras, proteínas) alcanzando un equilibrio, cambio en sus coeficientes de difusión, y alteración de equilibrio osmótico y viscosidad; alteraciones desconocidas en el apoplasto [pH, solubilidad de polisacáridos de pared celular (sustancias pécticas, permeabilidad de las paredes), proteínas unidas a pared celular (extensina, peroxidasa), pérdida de pared celular puesto que las silicuas tratadas con calor no son muy rígidas]. Desnaturalización de proteínas: extensiva en el caso de la β -glucosidasa, limitada por la actividad de la peroxidasa; hidrólisis de β -glucósidos, siendo inicialmente almacenados en la vacuola y puestos en presencia de β -glucosidasa citoplásmica por descompartimentación; y oxidación de naturaleza desconocida (pardeamiento, oscurecimiento, destrucción de proteína por taninos) (Brillouet y Odoux, 2010).

4.-Sudado: bajo el beneficiado tradicional el sudado, consiste en colocar las silicuas después del matado en mantas y colocarlas en un cajón para que se mantengan a alta temperatura (45 a 65 °C) y alta humedad por 8-12 horas, lo cual proporciona las condiciones para la producción de compuestos aromáticos. En esta etapa se desarrolla el sabor característico de la vainilla, aroma y color. Asimismo se pierde una parte de humedad reduciendo el contenido de agua disponible para prevenir el deterioro por microorganismos (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

En el beneficiado tradicional, el sudado se va alternando con el secado al sol hasta obtener la vainilla con las condiciones de humedad óptimas (aproximadamente 25 a 30 %) para proseguir con los oreados que son exposiciones al sol por periodos cortos de 30 min como máximo, dependiendo del criterio del maestro beneficiador. El objetivo de los pasos finales del beneficiado, incluyendo el secado y acondicionamiento, es secar las silicuas para preservar los compuestos fenólicos formados (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

5.-Secado al sol con sudores alternados: Las silicuas son expuestas al sol fuera de los cajones y posteriormente se regresan a los cajones cuando alcanzan una temperatura aproximada de 45 °C y se tapan con mantas para continuar con la exudación. Esta acción se repite hasta 30 veces y se prolonga hasta tres meses. Puesto que el contenido de humedad es el principal factor en la conservación de las silicuas beneficiadas de vainilla, la baja humedad es esencial para prevenir el crecimiento microbiano. Durante el secado es importante airear bien las silicuas, además de alcanzar la temperatura para el sudado, ya que con ello se previene la fermentación bacteriana, lo que llevaría a un sabor indeseable, conocido como vainilla creosotada (Odoux y Grisoni, 2011).

El secado es la etapa más difícil de controlar en el proceso de beneficiado, pues un secado irregular puede resultar en varios tamaños de silicua, producto de las diferencias en el contenido de humedad, influenciado por condiciones ambientales variables como horas al sol o variaciones en la humedad relativa. La etapa de secado es crítica para mantener la calidad, pues el secado prolongado puede llevar a pérdidas de sabor y contenido de vainillina (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

6.-Depósito provisional: La silicua beneficiada es depositada en cajas para observar la incidencia de plagas y enfermedades, normalmente se realizan tres revisiones.

7.-Clasificación: La silicua aprobada por el maestro beneficiador se clasifica, empaca y puede venderse a granel en papel encerado ó bolsas al vacío.



Figura 12. Proceso de beneficiado artesanal de la vainilla en Papantla, Veracruz, México.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del sitio de estudio

El trabajo se realizó de diciembre 2010 a marzo del 2011, en el Beneficio de vainilla La Alternativa, ubicado en el Ejido Primero de Mayo, Papantla, Veracruz, México.

4.2 Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó durante el proceso de beneficiado desde la recepción hasta la Revisión 2 usando placas Petrifilm™ y la vainilla beneficiada se analizó por el método de conteo en placa. Asimismo se realizó una prueba de esporulación de hongos.

4.2.1 Análisis microbiológico durante el proceso de beneficiado

Durante el proceso de beneficio se tomaron muestras durante las diferentes etapas y se realizó el cultivo en placas Petrifilm™ (Compañía 3M) específicas para los siguientes microorganismos: enterobacterias, coliformes totales y hongos y levaduras y se comparó con patrones provistos por la compañía. En total para esta etapa de análisis durante el proceso de beneficiado se analizaron 13 muestras, cada una con 3 repeticiones y cada repetición consistió de 3 silicuas (Figura 13).

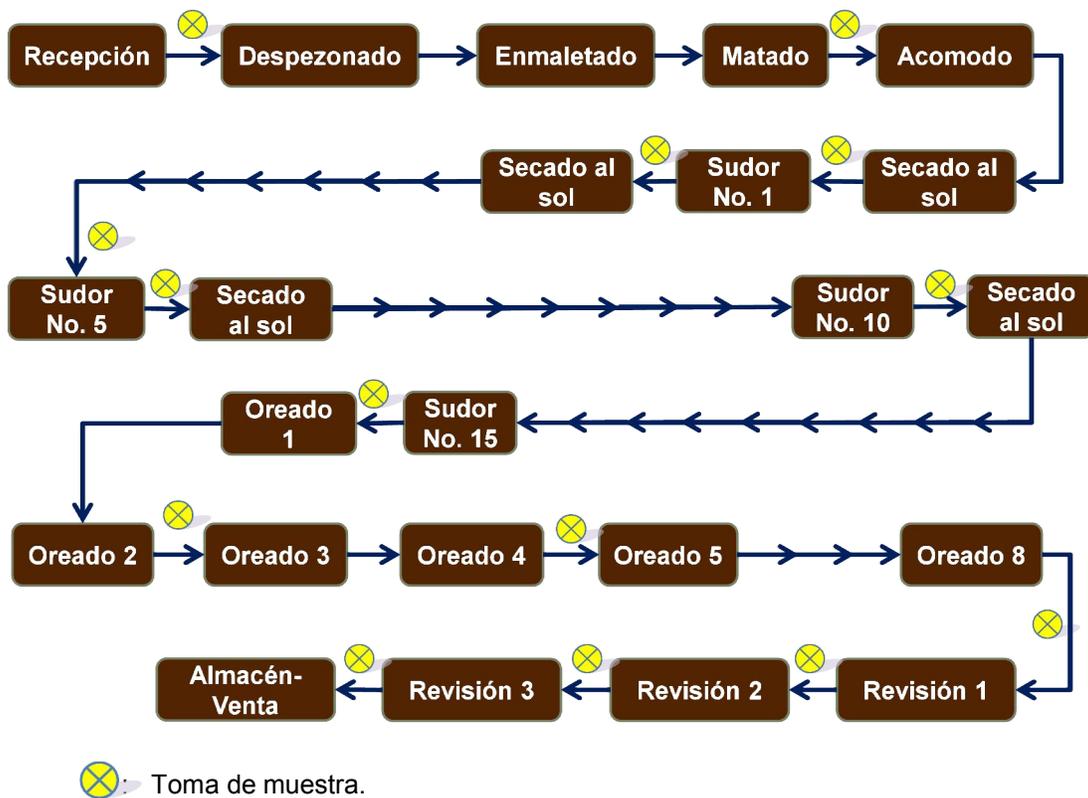


Figura 13. Muestreo del proceso de beneficiado artesanal de vainilla.

La toma de muestras se realizó de la siguiente forma:

1. Se colocaron las 3 silicuas en una bolsa de plástico y se lavaron con 10 mL de agua destilada esterilizada.
2. Se colocó la placa Petrifilm™ sobre una superficie plana, se levantó el film superior y con una pipeta Pasteur se inoculó 1 mL de la solución anterior en el centro del film inferior de la placa Petrifilm™.
3. El film superior de la placa Petrifilm™ se bajó con cuidado evitando introducir burbujas de aire. Se colocó el aplicador sobre el film superior y se presionó para repartir el inóculo sobre toda el área circular de la placa. Posteriormente se levantó el aplicador y se esperó 1 min para que el gel solidificara. En el caso de las placas para mohos y levaduras, éstas son planas y el aplicador es el que delimita el área circular para dispersión de la muestra.

4. Se incubaron las placas Petrifilm™ a temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) de acuerdo a lo siguiente:
 - a. Enterobacterias (24 a 48 h)
 - b. Coliformes totales (24 a 48 h).
 - c. Mohos y levaduras (3 a 5 días). Estas placas se incubaron dentro de un recipiente esterilizado y se colocó un frasco de plástico con agua estéril para proporcionar alta humedad que favoreciera el desarrollo de estos microorganismos minimizando la pérdida de humedad.
5. La interpretación de los resultados de las placas se realizó de acuerdo a la guía 3M™ Petrifilm™:
 - a. Recuento de enterobacterias
 - b. Recuento de coliformes.
 - c. Recuento de mohos y levaduras

4.2.2 Análisis microbiológico de la vainilla beneficiada

La vainilla beneficiada correspondiente a la muestra no. 14 se llevó al laboratorio de microbiología del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo, en donde se realizaron pruebas microbiológicas de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas mencionadas en la Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009, con algunas modificaciones.

Materiales

- Cuchillo
- Pinza
- Algodón
- Cajas Petri
- Haza metálica
- Varilla de vidrio
- Probeta graduada de 100 mL
- Vasos de precipitados de 1 L
- Tubos de ensayo
- Frascos de 500 mL
- Charolas de aluminio
- Alcohol
- Licuadora
- Hipoclorito
- Agua destilada
- Pipetas de 1y 10 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500, 1000 mL
- Balanza
- Incubadora
- Microscopio
- Tripié y rejilla
- Olla de presión
- Mechero de bunsen
- Estufa para esterilizar
- Charolas de plástico con tapa

Nota: todo el material estuvo esterilizado.

Medios de cultivo

- Agar para métodos estándar (AMS) para bacterias mesófilas aerobias.
- Agar rojo violeta bilis (ARVB) para coliformes totales.
- Agar papa dextrosa (PDA) para mohos y levaduras.
- Peptona.
- Caldo tetrionato (CT) para enriquecimiento de Salmonella.
- Caldo selenito cistina (CSC) para enriquecimiento de Salmonella.
- Agar Hecktoen (HD) para aislamiento de Salmonella.
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) para aislamiento de Salmonella.
- Agar sulfito de bismuto (ASB) para aislamiento de Salmonella.

Se analizaron 5 repeticiones de la vainilla muestreada después de la Revisión 3 del Depósito provisional, estas muestras correspondieron a la vainilla obtenida como producto final del beneficiado, la cual está lista para su venta o almacén. Para el análisis de hongos y levaduras, coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 25 g de silicuas de vainilla beneficiada y se homogenizó con 225 mL de solución estéril de peptona (0.1 %). Esta solución fue la dilución 10^{-1} .
2. Se realizaron diluciones 10^{-2} y 10^{-3} a partir de la muestra homogeneizada (10^{-1}).
3. De cada dilución, se inoculó por el método de difusión 0.1 mL en cajas Petri con 20 mL de medio de cultivo específico, es decir, con una pipeta se colocó 0.1 mL de la dilución al centro de la caja de Petri. Posteriormente se agregaron los 20 mL de medio de cultivo, se colocó la tapa de la caja de Petri y se dieron de 15 a 20 movimientos circulares (en forma de 8) para dispersar tanto el inóculo como el medio de cultivo en la placa. Se incubó de acuerdo a lo siguiente:
 - Hongos y levaduras en medio de cultivo PDA, se incubó a una temperatura de 25 °C y se observó al tercer y quinto día después de incubación.
 - Coliformes totales en medio de cultivo ARVB, se incubó a una temperatura de 35 °C y se observó a las 24 y 48 h después de incubación.
 - Bacterias mesófilas aerobias en medio de cultivo AMS, se incubó a una temperatura de 35 a 37 °C y se observó a las 24 y 48 h después de incubación.

El análisis de *Salmonella* spp., se realizó como sigue:

1. La muestra homogeneizada (10^{-1}), después de inocular las placas de Petri, se colocó en incubación a 37 °C por un tiempo de 48 h, esto correspondió a la fase de Pre-enriquecimiento para el análisis de salmonella.

2. Posteriormente se continuó con la fase de enriquecimiento, para lo cual se inocularon 4 tubos de ensaye, 2 con medio de cultivo CT y 2 con CSC.
 - 2.1. A cada tubo de ensaye se le colocó 9 mL de medio de cultivo (CT ó CSC) y se inoculó con 1 mL de la muestra pre-enriquecida.
 - 2.2. Se incubó a 37°C por un tiempo de 48 h.
3. Después del enriquecimiento, se prepararon los medios para la fase de aislamiento de Salmonella. Se colocó 15 mL de medio de cultivo por placa de Petri y se dejó solidificar. Se inocularon 2 placas de Petri por cada medio de cultivo: HD, XLD y ASB. En total fueron 6 placas de Petri por repetición. Se incubó a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 24 h y máximo 48 °C.

Para la repetición No.4, en la Figura 14 se muestra que del medio de cultivo ASB se prepararon dos placas de Petri (ASB 4.1 y ASB 4.2), en la placa ASB.4.1 se inocularon por estría cruzada tomando muestras de los tubos de ensaye 1 y 2 que correspondían a la fase de enriquecimiento con el medio de cultivo CT. En la segunda placa con medio de cultivo ASB.4.2, se sembró tomando muestras de los tubos de ensaye 3 y 4 de enriquecimiento correspondientes al medio de cultivo CSC.

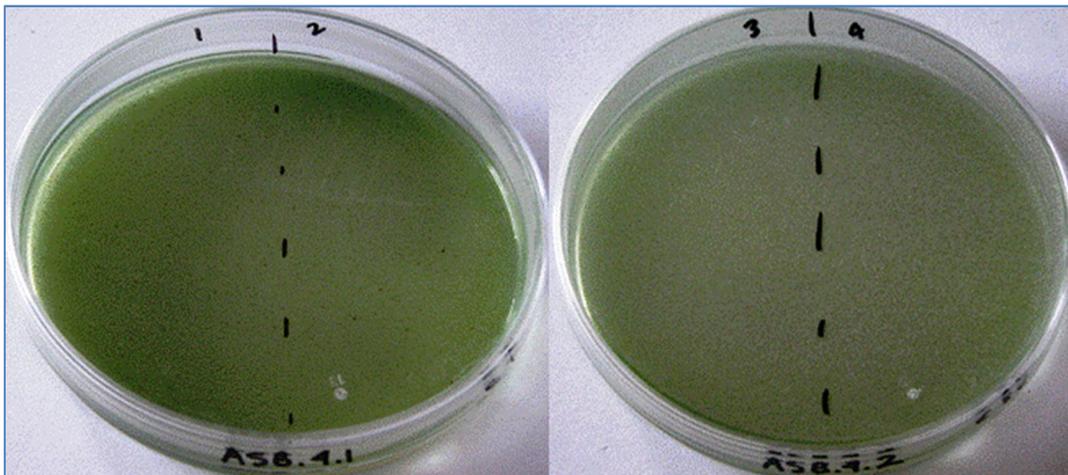


Figura 14. Cajas Petri con cultivo ASB.

4.2.3 Análisis microbiológico de esporulación de hongos

Se realizó una prueba de esporulación de hongos a la vainilla beneficiada, se analizaron cinco repeticiones de 10 silicuas cada una.

Materiales

- Pinza
- Recipiente de plástico
- Rejilla de plástico
- Mechero de Bunsen
- Agua destilada esterilizada
- Hipoclorito a 1 %
- Alcohol 96 %

El análisis se realizó de acuerdo a lo siguiente para cada repetición:

1. Se preparó una solución de 250 mL, con hipoclorito de sodio (1 %) para eliminar bacterias.
2. Se eligieron 10 silicuas de vainilla con síntomas visibles de daños.
3. En un recipiente esterilizado, se colocaron los 250 mL de la solución con hipoclorito al 1 % y se sumergieron las silicuas de vainilla por un tiempo de 2 min, durante este tiempo se mantuvieron en movimiento las silicuas con ayuda de una pinza esterilizada previamente.
4. Posteriormente se desechó la solución con hipoclorito y se agregó agua destilada esterilizada para enjuagar las silicuas de vainilla eliminando el exceso de hipoclorito.
5. A continuación, se colocaron las silicuas sobre sanitas de papel para eliminar completamente el agua.
6. Se esterilizó un recipiente de plástico con tapa utilizando alcohol a 96° y algodón. Después, se colocó dentro del recipiente una encima de otra una capa

de algodón y una de sanitas de papel, y se agregó agua destilada esterilizada para humedecer. Se colocó encima una rejilla de plástico previamente esterilizada.

7. Con la ayuda de una pinza esterilizada, se colocó cada una de las silicuas de vainilla sobre la rejilla de plástico, procurando que quedaran separadas una de otra y sin que tocaran las sanitas de papel o el algodón humedecidos.
8. Se tapó el recipiente y se dejó a temperatura ambiente por un tiempo de 6 días, revisando diariamente que tuvieran humedad y al tercer día y sexto día la presencia de hongos.

4.3 Análisis de Compuestos Fenólicos

Para el análisis de compuestos fenólicos se realizó primero la extracción y posteriormente su cuantificación en el HPLC.

4.3.1 Extracción

El proceso de extracción se realizó siguiendo la metodología de Pérez-Silva *et al.* (2006), con algunas modificaciones.

1. Las muestras de vainilla del proceso de beneficiado fueron guardadas en etanol (96 %) se tomaron 14 muestras en total cada una con tres repeticiones. En el laboratorio se retiró el exceso de etanol de las silicuas y se dejó por 24 h a que se ventilara y evaporara el etanol residual.
2. Posteriormente se secaron las silicuas por el método de liofilización, para lo cual de cada repetición 1 silicua de vainilla se cortó en trozos pequeños de 1 cm aproximadamente y se envolvió en papel aluminio, se hicieron pequeñas

perforaciones para permitir el flujo de aire, se colocaron varios paquetes de silicuas en un matraz kitasato de 1 L, se sellaron los orificios uno con tapón de hule y el otro con parafilm. El matraz kitasato se colocó en el ultracongelador (Thermo electron corporation modelo 703), por un tiempo de 12 h a una temperatura de - 63 °C.

3. El matraz kitasato se colocó en la liofilizadora (Lanconco modelo 75034 & 75035) por un tiempo de 10 h aproximadamente, después se revisaron las muestras para determinar si se requería mayor tiempo de secado, realizando en total tres ciclos de congelación-liofilización.
4. Las muestras liofilizadas se molieron manualmente en un mortero y se colocaron en viales de 10 mL.
5. Para cada repetición se pesó 100 mg de silicua de vainilla molida en una báscula marca Mettler HK 160 con precisión de 0.1 mg y se colocó en un tubo de ensayo de plástico con tapa de 50 mL.
6. Se preparó la solución de extracción para 10 muestras, para lo cual se colocó en un frasco de vidrio 20 mL de agua destilada, 80 mL de éter etílico grado reactivo (J.T. Baker) y 80 mL de pentano grado reactivo (J.T. Baker). A cada muestra se le agregó 18 mL de la solución de extracción.
7. El tubo de ensayo con la muestra se colocó en un recipiente con hielo para evitar calentamiento de la muestra por fricción al homogenizar debido a la alta velocidad a la que trabajaría el equipo y se introdujo al homogenizador (Heidolph modelo DIAX 600) a 9500 rpm por 4 min.
8. La muestra homogenizada se colocó en la centrífuga (Modelo 5804, Eppendorf) a 4500 rpm por un tiempo de 5 min y temperatura de 16 °C.
9. La muestra se colocó en un matraz de bola y se concentró en un rotaevaporador (modelo B-480 marca Büchi) a una temperatura de 32 °C y condiciones de vacío máximo de 40 cm Hg, la muestra se dejó hasta secar.
10. Para recuperar la muestra del matraz bola se agregó 1 mL de fase móvil (75% H_2PO_3 (0.01 mol L^{-1}) – 25% metanol), esto se realizó en dos partes de 0.5 mL

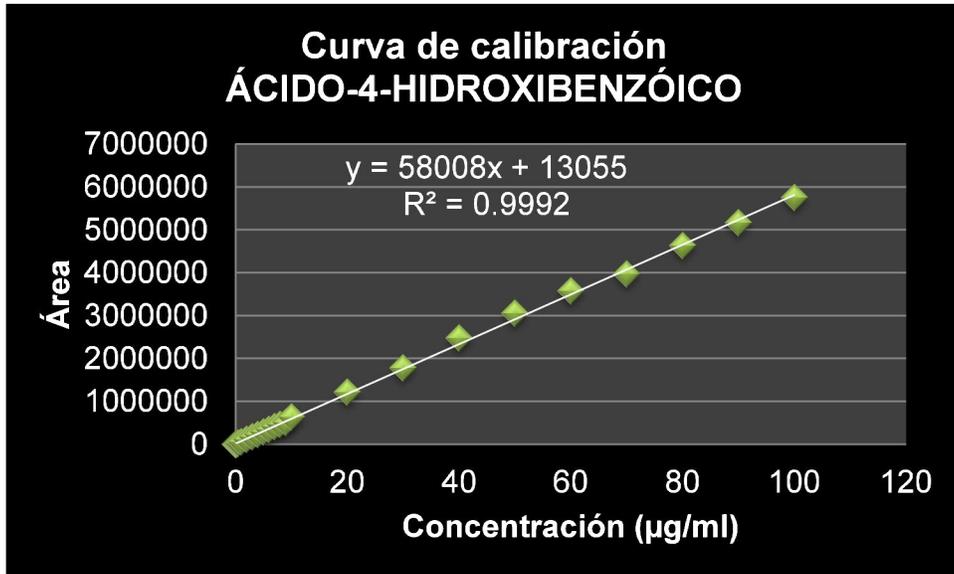
cada una con una micropipeta automática, para recuperar la mayor cantidad de muestra. Posteriormente la muestra se guardó para su análisis correspondiente en el HPLC.

11. Para todas las muestras en etanol del punto 1, se concentraron en un rotaevaporador a una temperatura de 60 °C y condiciones de vacío máximo (50 cm Hg), la muestra se dejó secar para posteriormente recuperar en 1 mL de fase móvil para su análisis por HPLC, en caso necesario se realizaron diluciones, que se consideraron en la parte de cuantificación analítica.

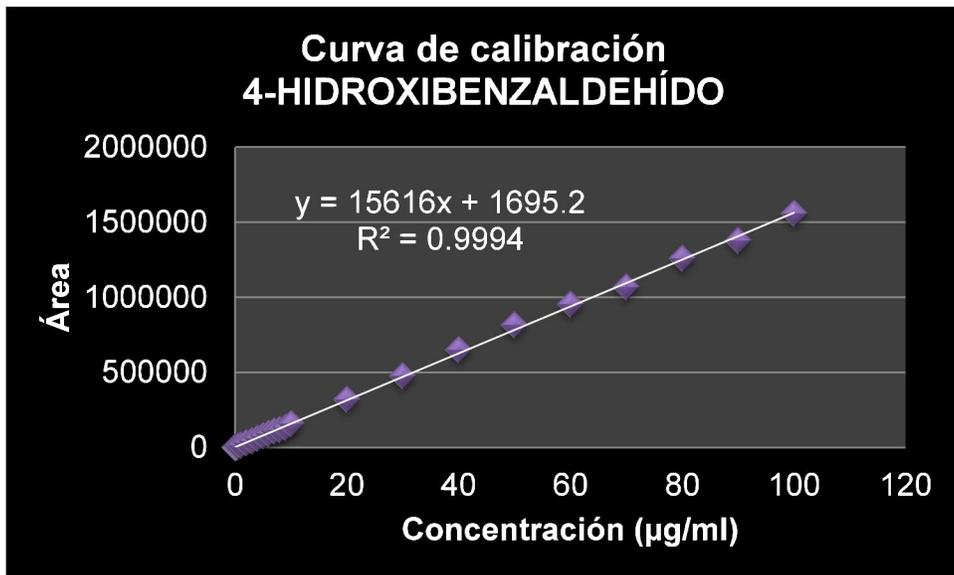
4.3.2 Análisis de compuestos fenólicos en el HPLC

El proceso de cuantificación se realizó siguiendo la metodología de Pérez-Silva *et al.* (2006).

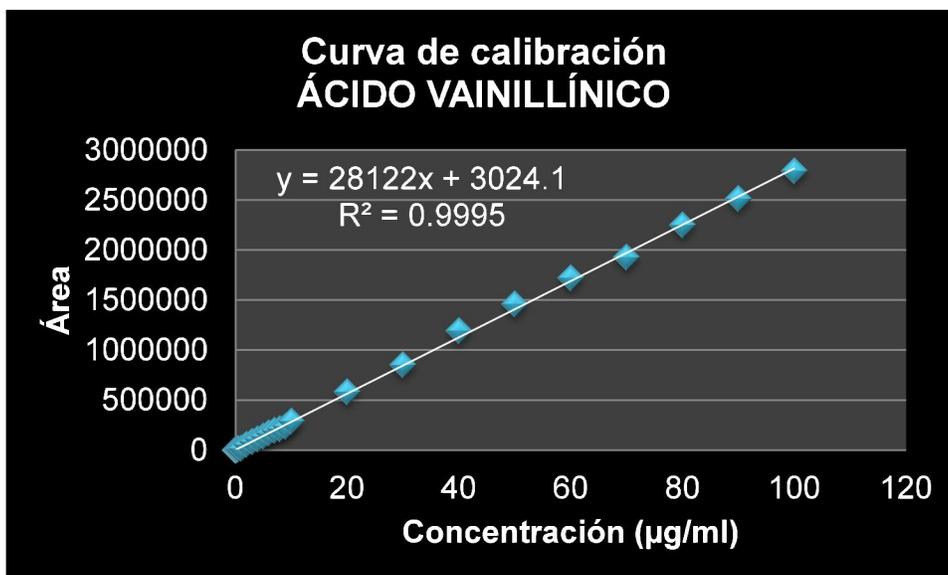
1. Se prepararon la fase móvil (75 % H_2PO_3 10^{-2} M – 25 % metanol) y las soluciones estándar de vainillina, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzóico y ácido vainillínico para la curva estándar (NOM-074-SCFI-2009) (Figura 15). La fase móvil fue filtrada al vacío, usando una membrana PVDF de 47 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro (Pall). Se usó un motor (Koblenz modelo FE-1500 de 1/4 HP, 10 psi).



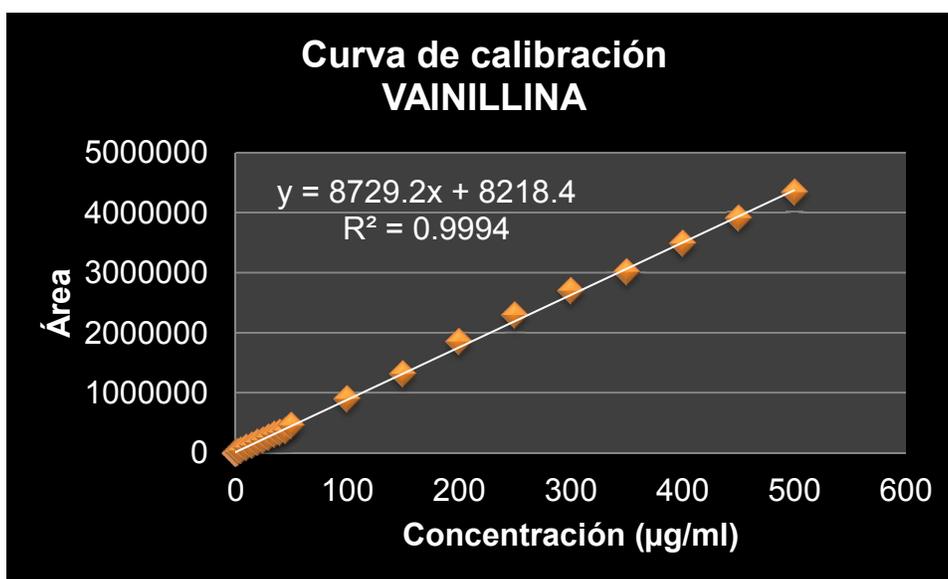
(a)



(b)



(c)



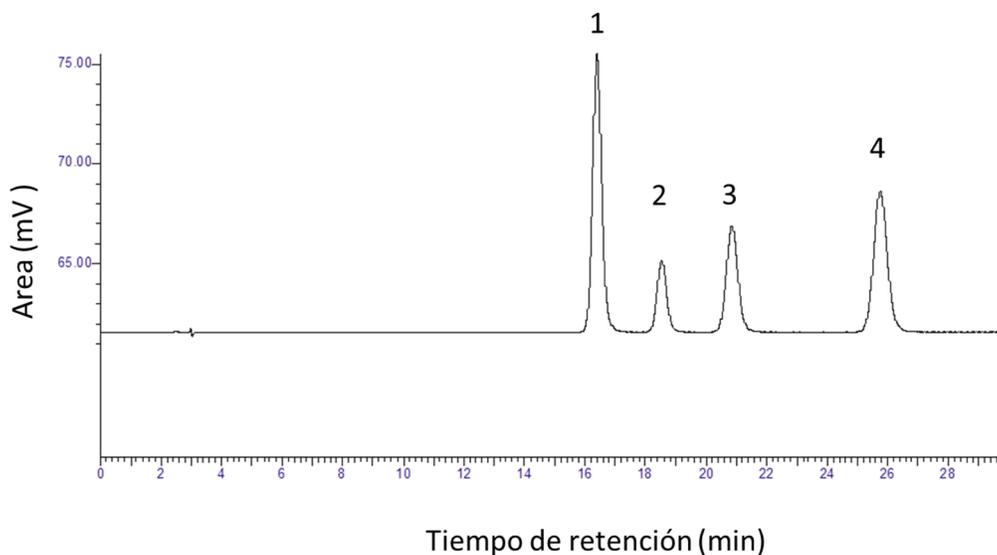
(d)

Figura 15. Curvas de calibración para los principales compuestos: (a) ácido 4-hidroxibenzóico; (b) 4-hidroxibenzaldehído; (c) ácido vainillínico; (d) vainillina).

- El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Series 200 marca Perkin Elmer, detector UV-VIS, con una columna C18 5 µm

250x4.6 mm (Serie 08010034K). Las condiciones de trabajo fueron el flujo de 1 mL min^{-1} , temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, tiempo de corrida 30 min, detección de UV a 254 nm , volumen de inyección de $10 \text{ }\mu\text{L}$ (Figura 16).

3. Las muestras se filtraron previamente a la cuantificación, usando un acrodisco LC 13 mm, tamaño de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$, marca Pall, se acopló a una jeringa 5 mL. Los viales con la muestra filtradas se colocaron en el Automuestreador del HPLC, toda vez que las condiciones del equipo estuvieron listas. En los casos que se requirió, se realizaron las diluciones necesarias y se volvió a analizar por HPLC.
4. Después de analizar las muestras, se obtuvieron los datos de áreas y se realizaron los cálculos de concentración correspondientes.



(1) ácido 4-hidroxibenzoico; (2) 4-hidroxibenzaldehído; (3) ácido vainillínico; (4) vainillina. La concentración de estos compuestos es 5:5:5:25 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) del 1 al 4.

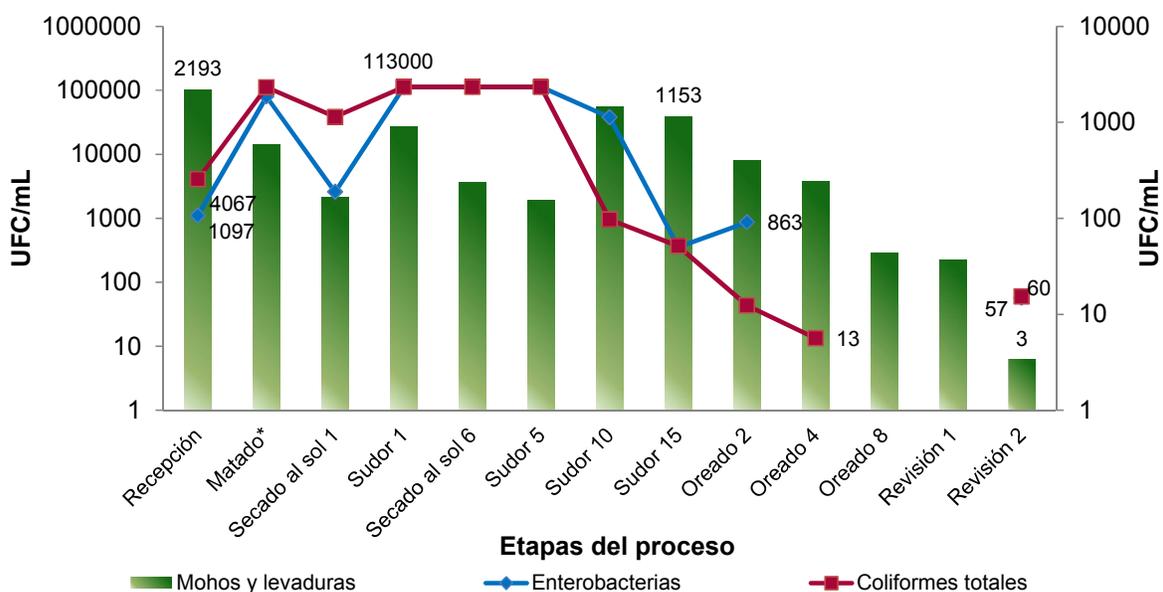
Figura 16. Cromatograma de una mezcla de los cuatro principales compuestos fenólicos en silicuas de vainilla.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis Microbiológico

5.1.1 Análisis microbiológico durante el proceso de beneficiado

Los resultados mostraron un aumento de enterobacterias y coliformes totales hasta el sudor No. 5, con una disminución hacia el final del proceso (oreado No.4) a partir del cual no se detectaron UFC de éstos microorganismos (Figura 17).



* Esta muestra se tomó al siguiente día después del matado, antes del primer secado al sol.

Figura 17. Recuento total promedio de enterobacterias, coliformes totales y mohos-levaduras.

Al momento de la recepción se detectó la presencia de mohos y levaduras que se redujo después del matado de la silicua. Es importante notar que hubo un

aumento en la carga microbiana después del matado con agua caliente (aproximadamente $100\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$), debido a un incremento de la humedad y temperatura de las silicuas. Brock (1978) menciona que la temperatura límite general para el crecimiento bacteriano es mayor a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo para las bacterias mesófilas aerobias el intervalo de crecimiento es entre $20\text{-}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Prescott *et al.*, 2002). Al día siguiente la temperatura a la cual se sacaron las silicuas del cajón fue de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ en promedio, lo cual se encuentra dentro del intervalo óptimo de crecimiento de bacterias mesófilas. En las muestras tomadas después del secado al sol No.1 se observó una disminución en la cuenta de enterobacterias y coliformes totales, debido a la reducción de la humedad causada por la exposición directa al sol manteniendo su temperatura alrededor de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así pues las bacterias más resistentes, durante el sudado (tiempo de 12 horas y con disminución gradual de la temperatura) aumentaron la carga microbiana, ya que la temperatura al día siguiente del sudado fue de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto aunado a la humedad liberada por las silicuas, así como la menor competencia de bacterias. Es importante mencionar que de acuerdo a los datos registrados, la mayor parte de las enterobacterias detectadas, que resistieron condiciones adversas son coliformes totales, cuya cuenta microbiana es similar a los muestreos de los puntos: Sudor No.1 y 5, así como el Secado al Sol No. 6.

A partir del sudor No. 10 se observó una disminución de la cuenta total de enterobacterias y coliformes totales, de acuerdo a los principios del proceso de beneficiado, esto es, temperatura para el proceso de secado, disminución del pH, concentración de sólidos junto con restricción del contenido de humedad de la silicua lo cual redujo la actividad del agua disponible, hasta tal punto que no se encontraron enterobacterias en las muestras del oreado No.4 hasta la Revisión No.1. y coliformes totales del oreado No.8 a la Revisión No.1.

En cuanto a la disminución del pH, las bacterias crecen en intervalos estrechos de pH desarrollándose la mayoría a valores neutros o ligeramente alcalinos. En las primeras etapas del beneficiado de vainilla ocurre un aumento de la actividad microbiana además de los cambios fisicoquímicos en la silicua, las bacterias al utilizar la glucosa mediante la fermentación, producen ácido láctico reduciendo el pH hasta en dos unidades, pudiendo llegar por debajo de su límite inferior ocasionando la inactivación del crecimiento (Brock, 1978). Asimismo la actividad de agua (a_w) ó agua disponible para las bacterias, se ve afectada por el contenido de humedad, que ocurre durante las fases de secado al sol con el incremento en la concentración de solutos y la acumulación de compuestos fenólicos. Las bacterias tienen la capacidad de crecer a valores de a_w por ejemplo *Escherichia coli* (0.935 – 0.960), *Salmonella* spp. (0.945), *Bacillus subtilis* (0.950), *Sarcina* sp. (0.915-0.930), *Micrococcus roseus* (0.905) y *Staphylococcus aureus* (0.900) (Brock, 1978).

Los compuestos fenólicos restringen el crecimiento microbiano, en el caso de la vainillina se ha mostrado su acción germicida en *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Candida albicans*, *Lactobacillus casei*, *Penicillium expansum* y *Saccharomyces cerevisiae*, así como en *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua* (Odoux y Grisoni, 2011).

En la Revisión No. 2 se observaron enterobacterias y coliformes totales con un conteo en promedio de 57 UFC mL⁻¹ y 60 UFC mL⁻¹ respectivamente. Esto puede atribuirse a una recontaminación de las silicuas, ya que las condiciones climáticas del lugar en el momento de la revisión eran de alta humedad (neblina y nubosidad), temperatura cálida, así como falta de condiciones asépticas lo cual pudo haber influido. En las Figuras 18 y 19 se observa la carga microbiana de enterobacterias y coliformes totales en muestras tomadas en la recepción de las silicuas y en la Revisión número 2.

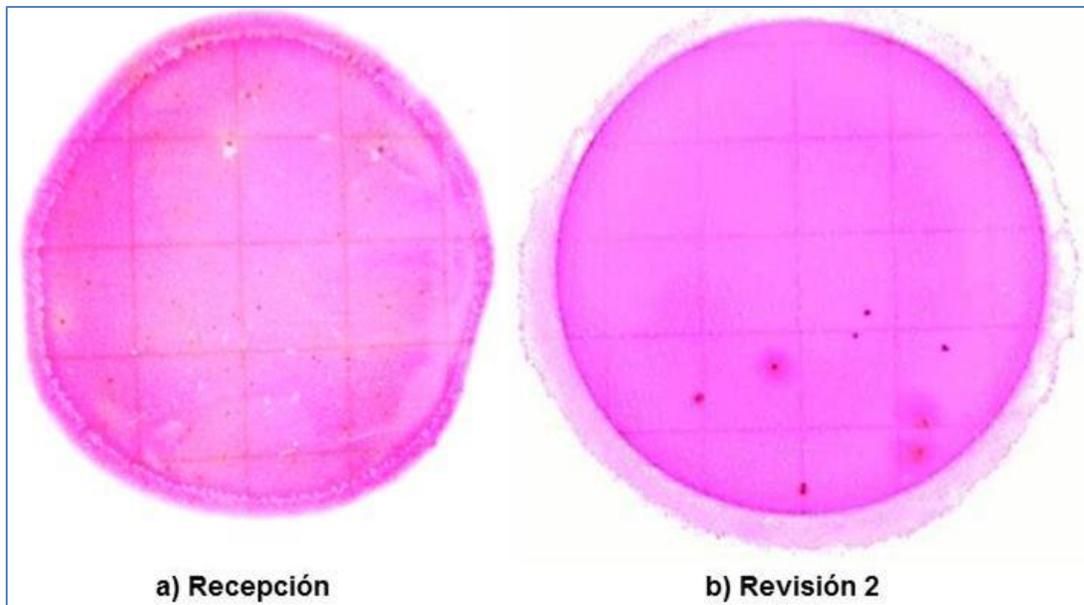


Figura 18. Carga microbiana de enterobacterias en Recepción y Revisión No.2.

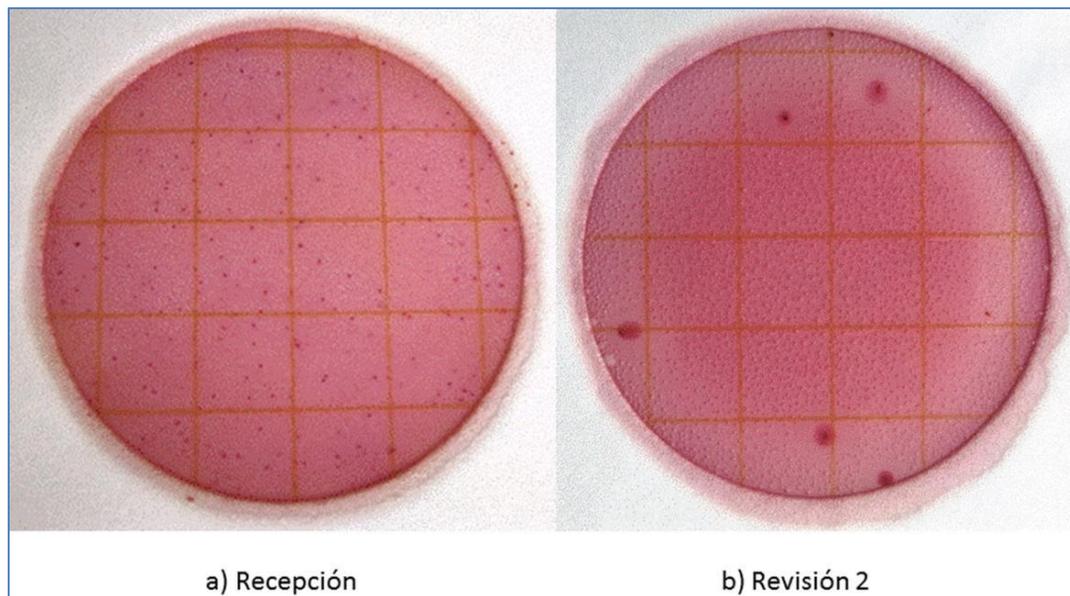


Figura 19. Carga microbiana de coliformes totales en Recepción y Revisión No.2.

La contaminación microbiana por bacterias, mohos y levaduras puede ocurrir en cualquier etapa del proceso productivo, desde la cosecha hasta el

beneficiado y almacenamiento. Después del matado se han encontrado cepas de *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus smithii*) debido a su naturaleza termofílica y formadora de esporas; asimismo en silicuas abiertas antes del matado se han reportado géneros como *Xanthomonas* spp., *Cellulomonas* spp., *Vibrio* spp., *Staphylococcus* spp., y *B. subtilis* (incluyendo *B. licheniformis*) que son bacterias de descomposición (Odoux y Grisoni, 2011; Röling *et al.*, 2001).

El recuento total de mohos y levaduras durante el proceso de beneficiado mostró variaciones, después del matado y secado al sol No.1, mostrando reducciones cuando se presentaron temperaturas superiores a 35–37 °C (Figura 17) (Frazier, 1976). Posteriormente se observó un aumento de la cuenta en el sudor No.1 con disminución hasta el sudor No.5, pudiendo existir una competencia con el desarrollo bacteriano (Frazier, 1976). Sin embargo en el Sudor No.10 se presentó aumento de la presencia de mohos y levaduras, posiblemente debido a la baja actividad acuosa e incremento de compuestos fenólicos que funcionan como bacteriostáticos, como la vainillina.

Brock (1978) menciona que las levaduras y hongos tienen mayor capacidad para crecer en medios con actividades de agua más bajas, por ejemplo *Aspergillus niger* (0.88), *Aspergillus glaucus* (0.78), *Xeromyces bisporus* (0.60), así como levaduras como *Candida utilis* (0.94), *Schizosaccharomyces* sp. (0.93) y *Saccharomyces rouxii* (0.60). Además de crecer mejor en medios ligeramente ácidos (pH entre 5 y 6).

En las revisiones del depósito provisional se encontró la presencia de mohos y levaduras con cuentas de 3 UFC mL⁻¹. Al igual que para las bacterias la

vainillina ha mostrado ser efectiva en la inhibición del crecimiento de mohos como *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus* (Odoux y Grisoni, 2011).

En el Oreado No.8 y la Revisión No.1 la variación en el número de UFC fue mínimo (43 y 37, respectivamente); es importante notar que las condiciones en el depósito provisional (baja disponibilidad de oxígeno y el aumento en la concentración de compuestos fenólicos) pudieron inhibir el desarrollo de mohos y levaduras. Después de la Revisión No.2 se encontraron 3 UFC mL⁻¹, pero debe considerarse que en la Revisión No.1, se eliminaron las silicuas con mohos y a otras se les dio un baño de jarabe ó extracto de otras silicuas de vainilla. Aunque en las últimas etapas del proceso de beneficiado hay un aumento en la concentración de compuestos fenólicos que están afectando la carga de mohos y levaduras, se pueden presentar incluso especies con la capacidad de degradar compuestos fenólicos como el ácido benzoico (Frazier, 1976) (Figura 20).

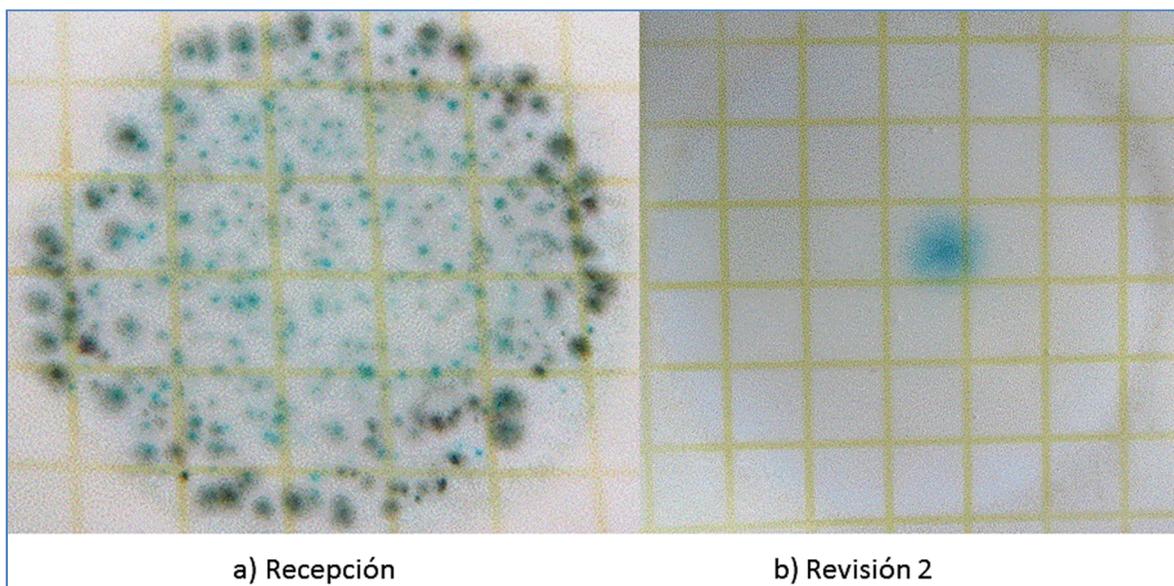


Figura 20. Carga microbiana de mohos y levaduras en Recepción y Revisión no.2.

Se han reportado en vainilla de Madagascar e islas Comores diversos géneros de mohos involucrados en la contaminación microbiana de la silicua por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Penicillium lividum*, *Penicillium vanillae*, y *Penicillium rugulosum* (Röling *et al.*, 2001), además de *Penicillium glaucum*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus amstelodami*, y *Xanthochytrium sp.* (Odoux y Grisoni, 2011). Es importante mencionar que durante todo el proceso de beneficiado de vainilla se fueron eliminando aquellas silicuas que presentaban mohos y levaduras. Especies de *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*, junto con *Fusarium spp.*, son los géneros más importantes por su capacidad de generar micotoxinas, por ejemplo *A. niger* produce ocratoxina A, *A. oryzae* que está estrechamente relacionada con *A. flavus* que produce aflatoxinas en alimentos (Odoux y Grisoni, 2011).

5.1.2 Análisis microbiológico de la vainilla beneficiada

En relación al análisis microbiológico realizado a la vainilla beneficiada, en la Figura 21 se observa la alta carga microbiana correspondiente a bacterias mesófilas aerobias con un conteo de 2.7×10^6 UFC g⁻¹, lo cual significa que no cumple con lo especificado en la Norma Mexicana NMX-SCFI-074-2009 que establece un límite de 100 UFC g⁻¹ máximo, esto basado a su vez en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994.

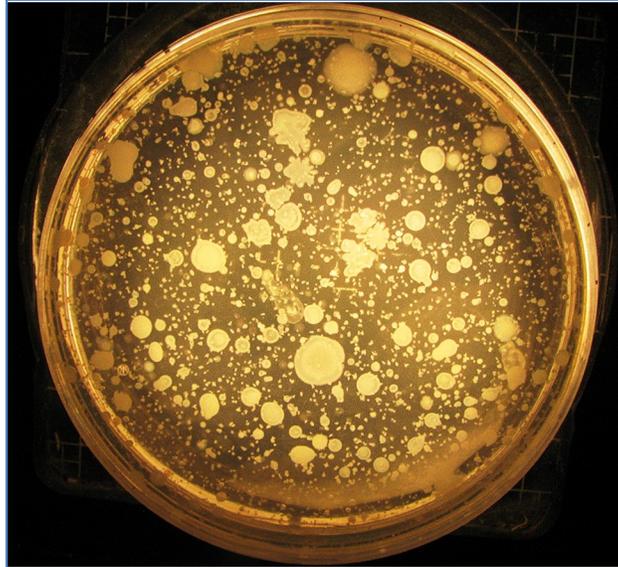


Figura 21. Bacterias mesófilas aerobias en vainilla beneficiada.

En esta prueba se evaluaron bacterias mesófilas aerobias, que incluye enterobacterias y coliformes totales, pudiendo encontrarse especies como *Bacillus psychrophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rhodospirillum rubrum* y *Anabaena variabilis* (Prescott *et al.*, 2002). En cuanto a la evaluación de coliformes totales, mohos y levaduras, así como *Salmonella* spp., en vainilla beneficiada, las pruebas fueron negativas (Figuras 22, 23 y 24).

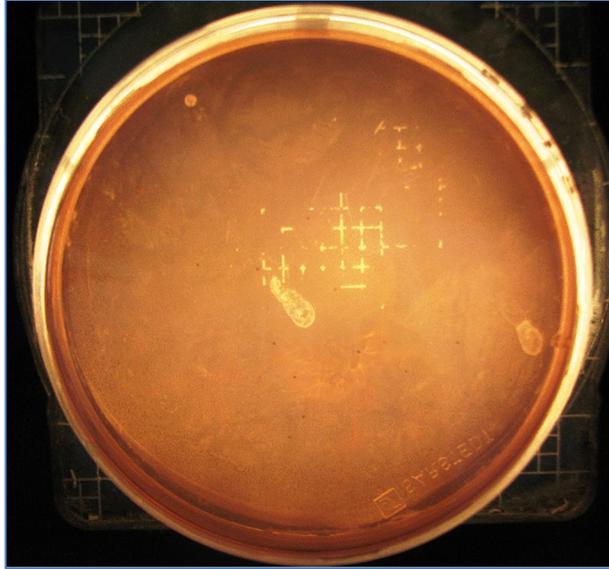


Figura 22. Prueba negativa de coliformes totales en vainilla beneficiada.

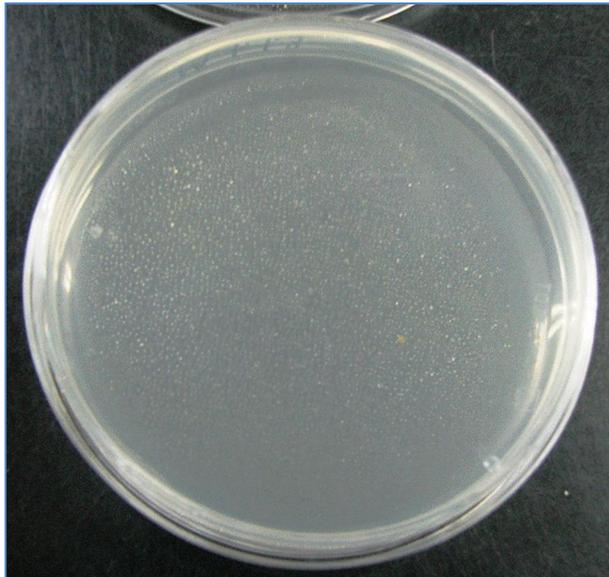


Figura 23. Prueba negativa de mohos y levaduras en vainilla beneficiada.

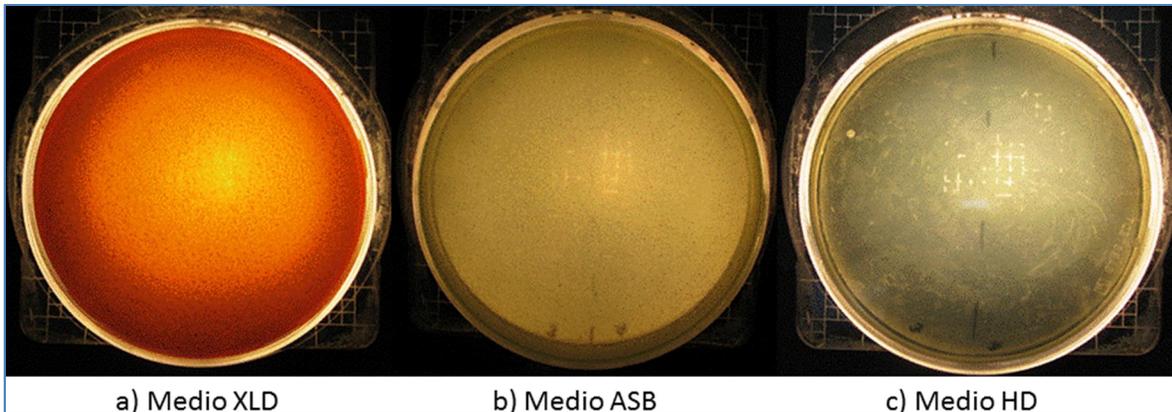


Figura 24. Prueba negativa de Salmonella en vainilla beneficiada.

5.1.3 Análisis microbiológico de esporulación de hongos

La prueba específica para esporulación de hongos, resultó negativa, esto se observa en la Figura 25, con lo cual se confirma la ausencia de mohos y levaduras en la vainilla beneficiada. Es importante mencionar que en la fase de campo en la Revisión No. 2 se detectaron 3 UFC mL^{-1} y tanto en la prueba de mohos y levaduras como en la de esporulación de la vainilla beneficiada no se detectó la presencia, posiblemente debido a las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y a la acumulación de compuestos fenólicos, aunado a que tanto en la Revisión No. 1 como en la Revisión No. 2 se aplicó aceite extraído de las silicuas de vainilla a las que presentaban algún síntoma.

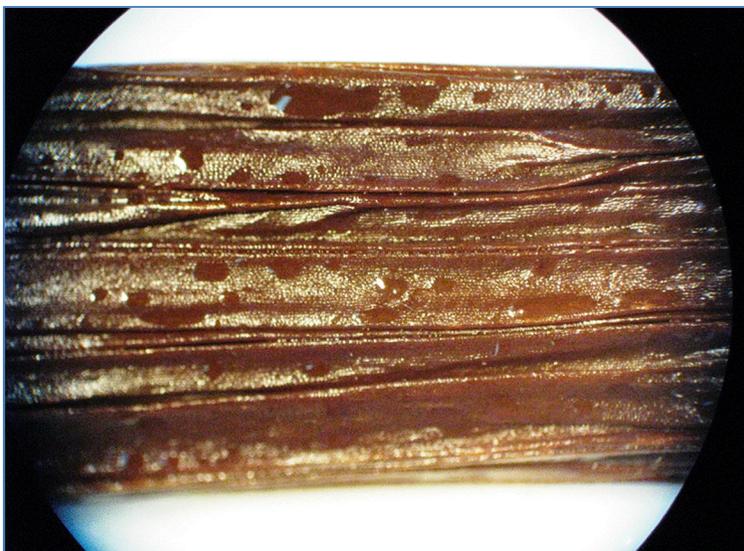


Figura 25. Prueba negativa de esporulación de hongos.

5.2 Análisis de Compuestos Fenólicos

5.2.1 Análisis de compuestos fenólicos en el HPLC

El proceso de beneficiado inicia con la operación del matado, misma que se realizó un día después de la recepción (Figura 26); las silicuas pueden estar almacenadas hasta tres días después de la cosecha sin pasar a la operación de matado, ya que el contenido de vainillina aumenta, sin embargo, después del cuarto día, ocurre una disminución en este compuesto (Krishnakumar *et al.*, 2007).



Figura 26. Recepción de silicuas verdes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks).

En la silicua verde hay presencia compuestos fenólicos de forma glucosilada, sin embargo el contenido inicial se reduce en las silicuas un día después del matado (Figura 27), esto se debe posiblemente a una desnaturalización de los compuestos fenólicos por la alta temperatura del agua. El grado de hidrólisis de la glucovainillina está relacionado con la temperatura del tratamiento térmico, en donde a mayor temperatura, menor será la hidrólisis, además la β -glucosidasa es afectada por el pH ácido generado en la descompartimentación y mezclado del contenido celular. Diversos reportes muestran que las condiciones ideales del matado son de 63 °C por 5 min ó 65 °C por 3 min, lo cual permite el óptimo contenido de vainillina de las silicuas (Ranadive 1992; Krishnakumar *et al.*, 2007; Kanisawa 1993; Dignum *et al.*, 2004; Brillouet y Odoux 2010; Odoux y Grisoni, 2011).



Figura 27. Silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) un día después del matado.

El tratamiento térmico utilizado en el matado también influye en la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) que se inactiva a 80 y 85 °C, mismo que en el beneficiado tradicional no se está considerando actualmente ya que la PPO juega un papel clave en la calidad del color y propiedades comerciales de las silicuas beneficiadas y su extracto alcohólico final.

Después del matado se recomienda mantener envueltas las silicuas para conservar el calor y humedad, esenciales para el proceso de fermentación que se lleva a cabo en el sudado. Esto se observa en los pasos posteriores de alternación de sudado y secado al sol (Figuras 28 y 29), en los cuales se encontró mayor variación en la concentración de los compuestos fenólicos principalmente en ácido 4 – hidroxibenzóico (Odoux y Grisoni, 2011; Krishnakumar *et al.*, 2007; Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

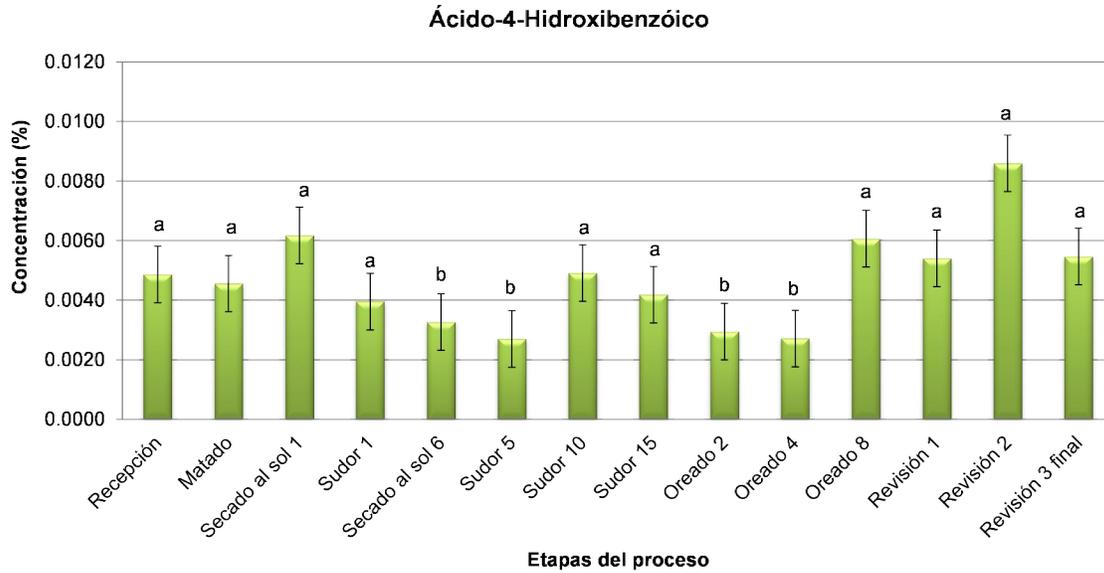


Figura 28. Desarrollo del ácido-4-hidroxibenzóico durante cada etapa el proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).

Pérez *et al.* (2011), reportan que el glucósido del ácido-4-hidroxibenzóico es poco hidrolizado durante el proceso de beneficiado, se origina rápidamente a partir de la oxidación de 4-hidroxibenzaldehído sugiriendo que su formación es más de origen oxidativo que glucosídico. Los resultados muestran una concentración final en la vainilla beneficiada fue de 0.005%, mientras que Gassenmeier *et al.* (2008) reportan concentraciones entre 0.019 y 0.034 %.



Figura 29. Secado y sudado de silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks).

El valor más alto del compuesto fenólico 4-hidroxibenzaldehído (Figura 30) se obtuvo en la Revisión 2 con 0.11% aunque sin diferencias significativas con el Oreado 8 y la Revisión 1, mientras que el valor final de la vainilla beneficiada fue de 0.07%. Gassenmeier *et al.* (2008), reportan valores entre 0.092 y 0.145 %.

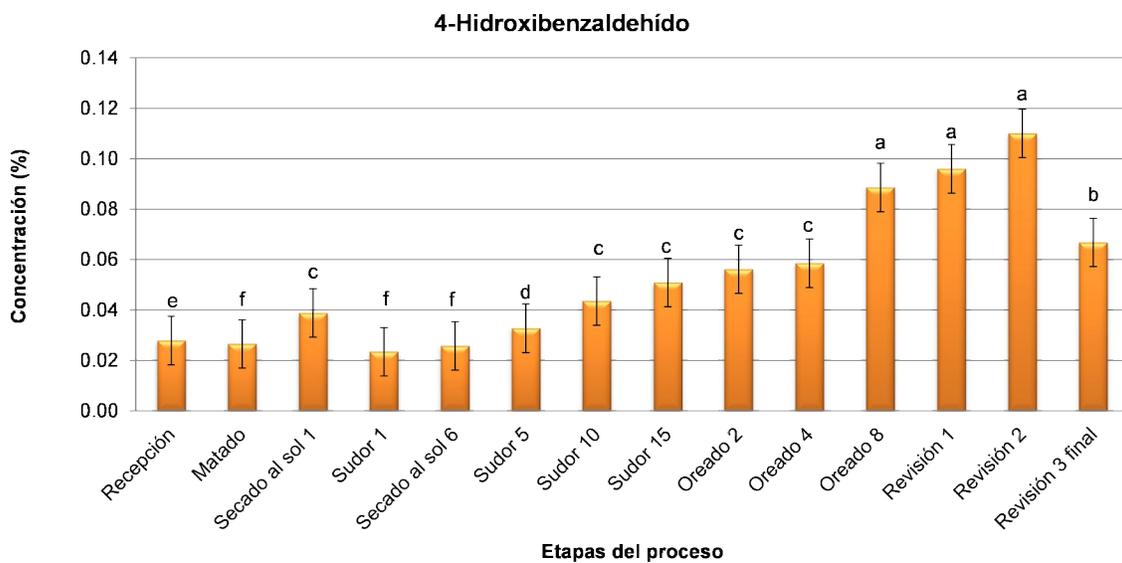


Figura 30. Desarrollo del 4-hidroxibenzaldehído durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).

En las Figuras 31, 32 y 33 se observan actividades intermedias en el proceso de beneficiado artesanal en el cual dado que se depende de las condiciones climáticas, el proceso puede verse interrumpido, colocando las silicuas a airear en espigueros para evitar el desarrollo de microorganismos. Asimismo, se va realizando una clasificación continua por tamaño y grado de beneficiado de silicuas como son cruda, blanda y entreseca, así como eliminación de silicuas con daño principalmente por microorganismos. Odoux y Grisoni (2011) mencionan que el secado al sol se realiza para estabilizar las silicuas para evitar la infestación de microorganismos, disminuyendo la humedad en las silicuas hasta un nivel máximo final entre 25 y 38%.



Figura 31. Silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) blanda durante el proceso de beneficiado.



Figura 32. Silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) entreseca durante el proceso de beneficiado.



Figura 33. Revisión y clasificación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) beneficiada.

Las concentraciones mayores del ácido vainillínico (Figura 34) se presentaron en las últimas etapas del proceso (Oreado 8), siendo la más alta en la Revisión 2 con 0.07% y en la vainilla beneficiada (Revisión 3 final) de 0.06%. Gassenmeier *et al.* (2008), reportan un valores entre 0.136 y 0.176.

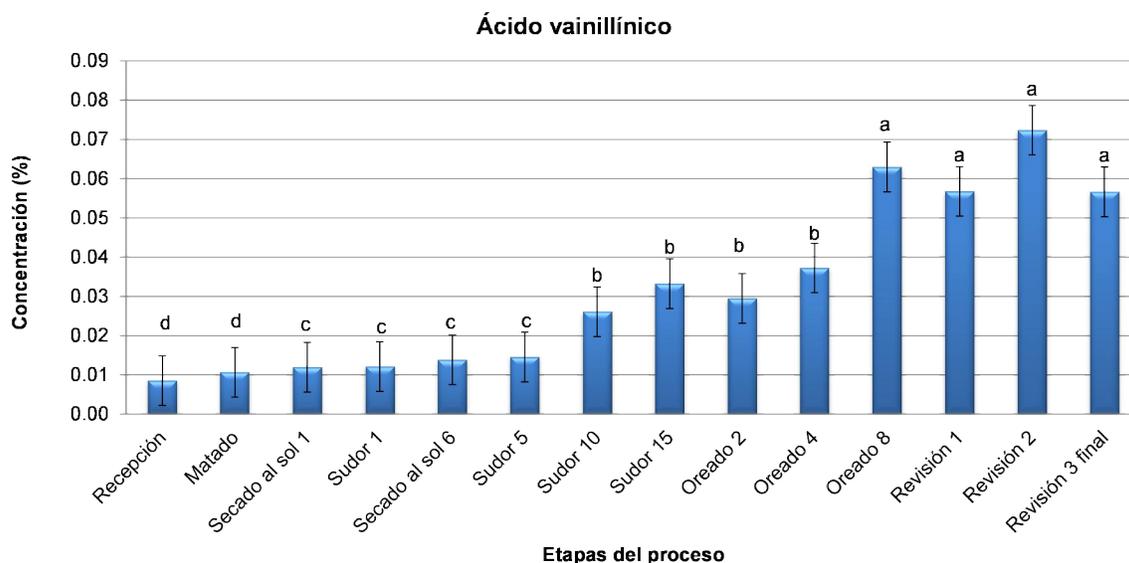


Figura 34. Desarrollo del ácido vainillínico durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).

Desde la recepción se cuantificó una pequeña cantidad de vainillina (Figura 35) ya que su acumulación comienza desde los 3 o 4 meses de desarrollo del fruto (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007). La mayor concentración de vainillina (1.55 %) se encontró en la muestra tomada en la Revisión 1 dentro del periodo de depósito provisional (Figura 36), Tapia-Ochoategui *et al.* (2011) encontraron la mayor concentración de vainillina al décimo ciclo de secado-sudoración con disminución en las siguientes etapas. En este caso no hubo diferencia significativa con las etapas de Oreado 4 a Revisión 2, sin embargo, en la vainilla beneficiada la concentración fue de 0.92 %, esta reducción para todos los compuestos fenólicos, se debe posiblemente al manejo en las revisiones del depósito provisional en donde la apertura del cajón que contiene las silicuas involucra un intercambio de

aire y humedad que puede estar ocasionando la oxidación de los mismos. Otro factor que puede estar influyendo en la disminución de los compuestos fenólicos entre ellos la vainillina, es la acción de la peroxidasa (Márquez *et al.*, 2008) ya que a pesar de que su función en el beneficiado consiste en el pardeamiento de la silicua, entre varios sustratos que utiliza, oxida compuestos aromáticos como la vainillina para producir divainillina, mientras que la polifenoloxidasas (Waliszewski *et al.*, 2009) utiliza mono-fenoles y di-fenoles para catalizar la oxidación de varios sustratos celulares, probablemente también vainillina, lo cual pudiera estar reduciendo el contenido de vainillina en la silicua beneficiada. En la Revisión 2 hubo un aumento del ácido vainillínico y una disminución de vainillina para la misma muestra, con respecto a la muestra de la Revisión 1. El 4-hidroxibenzaldehído presenta un comportamiento parecido a la vainillina. Pérez *et al.* (2011), mencionan que las pérdidas de vainillina pueden deberse a varios factores como son fenómenos bioquímicos/químicos, a la actividad de la peroxidasa, a la formación de enlaces entre la lignina de la silicua y la vainillina liberada por glucosidasa (que puede explicar hasta un 20 % de la pérdida de vainillina), de su oxidación a ácido vainillínico.

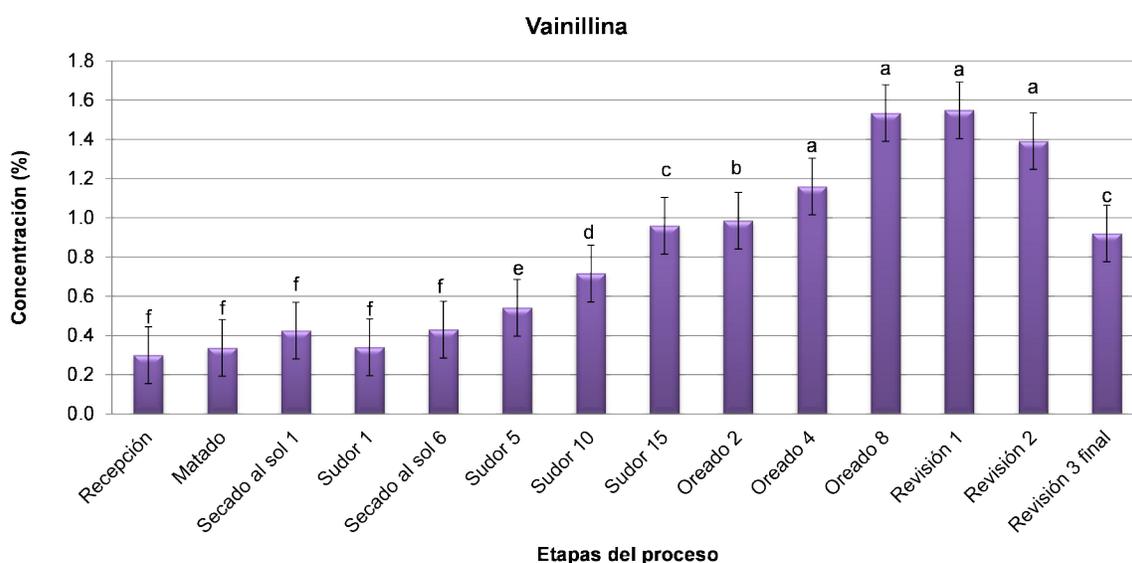


Figura 35. Desarrollo de la vainillina durante cada etapa del proceso de beneficiado de vainilla (n=3 ± ES).

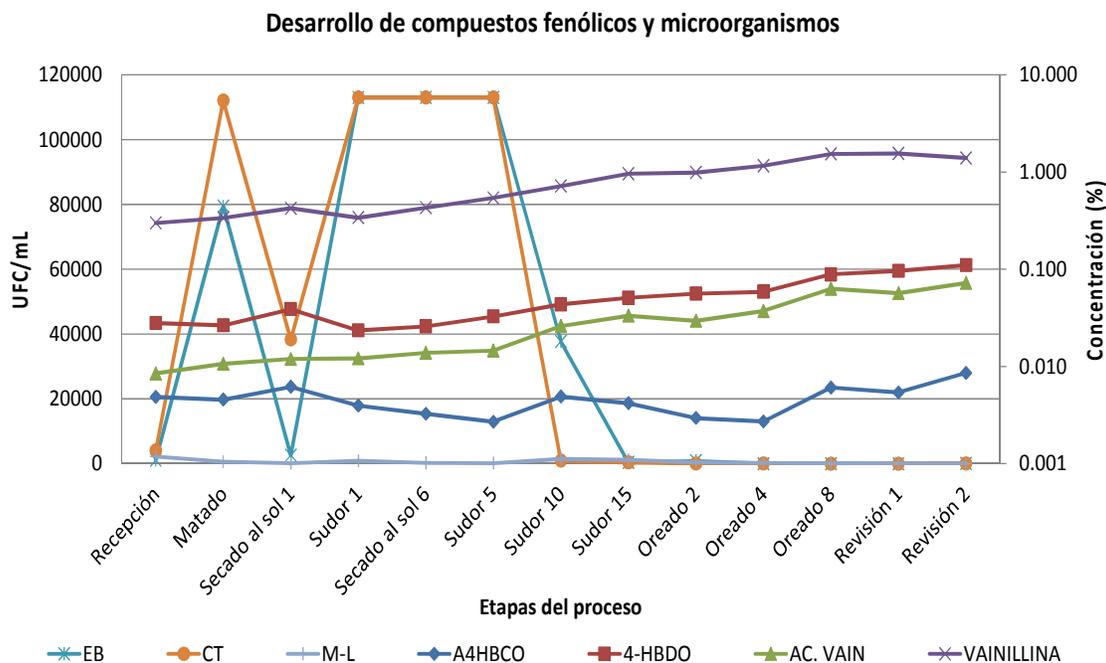


Figura 36. Depósito provisional de silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks).

Para el caso de la vainillina, Gassenmeier *et al.* (2008), reportan un contenido promedio de 1.9 %, con valores mínimo y máximo de 1.6 y 2.1 % respectivamente.

En la Figura 37 se observa que en las primeras etapas del proceso en donde hay alta carga microbiana principalmente de bacterias, el desarrollo de compuestos fenólicos se inicia, lo que parece indicar que el metabolismo de las bacterias se relaciona con el desarrollo de compuestos fenólicos, la degradación microbiana de celulosa y hemicelulosa involucra las β -glucosidasas que afecta el contenido de glucósidos de la silicua. Asimismo la degradación de lignina por una amplia variedad de microorganismos como hongos, actinomicetos y bacterias producen compuestos aromáticos, además la actividad microbiana sobre los compuestos de la pared celular libera ácido ferúlico que puede ser transformado

por una gran variedad de microorganismos y hongos en compuestos aromáticos, tales como vainillina y guayacol (Röling *et al.*, 2001; Sciubba *et al.*, 2009).

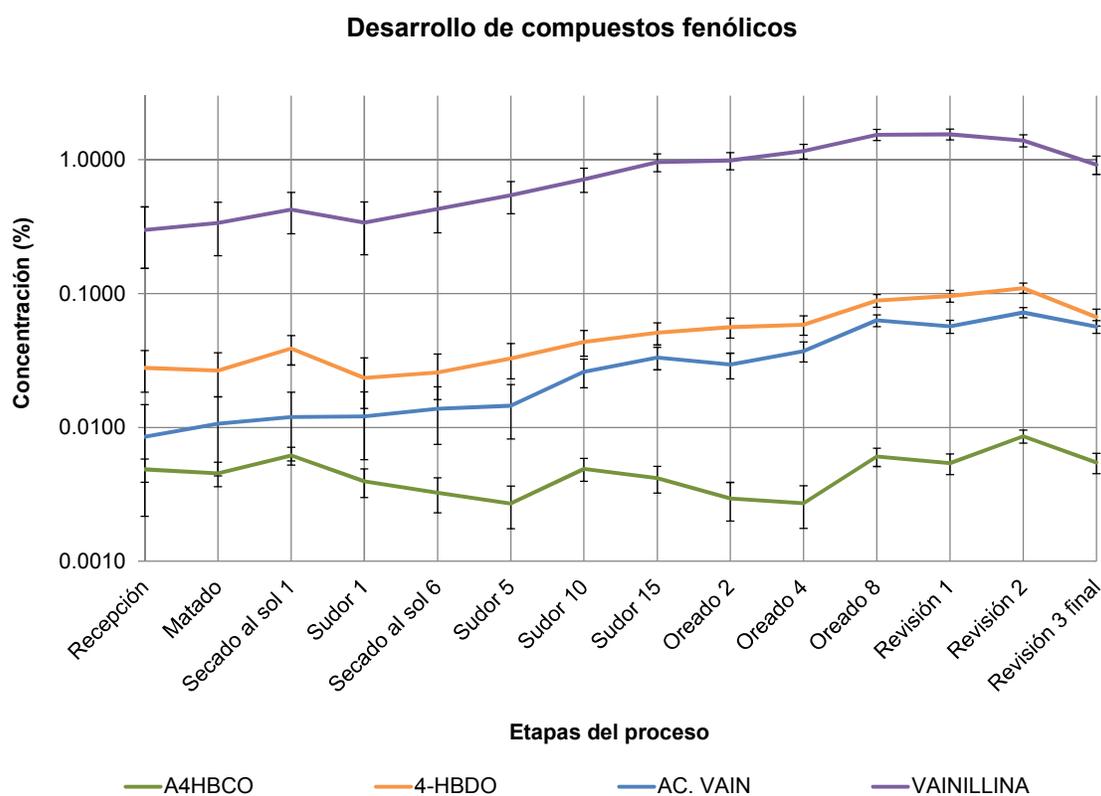


EB: Enterobacterias; CT: Coliformes totales; M-L: Mohos y Levaduras; A4HBCO: ácido-4-hidroxi-benzóico; 4-HBDO: 4-hidroxi-benzaldehído; AC. VAIN: Ácido vainillínico; VAINILLINA: Vainillina.

Figura 37. Desarrollo de compuestos fenólicos y microorganismos durante el proceso de beneficiado de vainilla.

Röling *et al.* (2001) mencionan que las especies del género *Bacillus* spp., son las que predominan en el proceso de beneficiado de vainilla, algunas especies como *B. subtilis* y *B. licheniformis* tienen actividad enzimática como proteasas, hemicelulasas, celulasas y β -glucosidasas que ayudan en el proceso de degradación y consumo de componentes celulares, sin embargo las especies pueden variar de un lote a otro por las diferencias en condiciones ambientales y de proceso, y por lo tanto la influencia de la actividad microbiana sobre el desarrollo del aroma en la vainilla también diferirá.

Se observa en la Figura 38 y el Cuadro 4 que el incremento en 4-hidroxibenzaldehído también se presenta en la vainillina, siendo que el 4-hidroxibenzaldehído un intermediario en la biosíntesis de vainillina (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007). Se determinaron los cocientes de compuestos fenólicos (Cuadros 5 y 6) para las muestras de vainilla en todo el proceso y en la vainilla beneficiada.



A4HBCO: ácido-4-hidroxibenzóico (Desviación estándar (s)=0.00191); 4-HBDO: 4-hidroxibenzaldehído (s=0.01924); AC. VAIN: Ácido vainillínico (s=0.01265); VAINILLINA: Vainillina (s=0.28944).

Figura 38. Desarrollo de compuestos fenólicos durante el proceso de beneficiado.

Cuadro 4. Desarrollo de compuestos fenólicos en el beneficiado artesanal de vainilla.

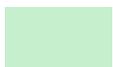
Compuesto fenólico / Etapa del proceso	Recepción	Matado	Secado al sol 1	Sudor 1	Secado al sol 6	Sudor 5	Sudor 10	Sudor 15	Oreado 2	Oreado 4	Oreado 8	Revisión 1	Revisión 2	Revisión 3 final
A4HBCO	0.0049 a	0.0046 a	0.0062 a	0.0040 a	0.0033 b	0.0027 b	0.0049 a	0.0042 a	0.0029 b	0.0027 b	0.0061 a	0.0054 a	0.0086 a	0.0055 a
4-HBDO	0.0279 e	0.0265 f	0.0389 c	0.0235 f	0.0258 f	0.0327 d	0.0436 c	0.0509 c	0.0562 c	0.0586 c	0.0886 a	0.0960 a	0.1100 a	0.0668 b
AC. VAIN	0.0085 d	0.0107 d	0.0120 c	0.0121 c	0.0138 c	0.0145 c	0.0261 b	0.0333 b	0.0295 b	0.0372 b	0.0630 a	0.0567 a	0.0723 a	0.0566 a
VAINILLINA	0.2991 f	0.3367 f	0.4247 f	0.3396 f	0.4295 f	0.5409 e	0.7162 d	0.9592 c	0.9852 b	1.1592 a	1.5336 a	1.5485 a	1.3908 a	0.9199 c

Letras diferentes en la misma hilera muestran diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

A4HBCO: ácido-4-hidroxibenzóico; 4-HBDO: 4-hidroxibenzaldehído; AC. VAIN: Ácido vainillínico; VAINILLINA: Vainillina.

Cuadro 5. Cocientes de compuestos fenólicos en muestras de vainilla del proceso de beneficiado artesanal.

Cocientes/Etapa del proceso	Recepción	Matado	Secado al sol 1	Sudor 1	Secado al sol 6	Sudor 5	Sudor 10	Sudor 15	Oreado 2	Oreado 4	Oreado 8	Revisión 1	Revisión 2	cocientes esperados
vainillina / p-hidroxibenzaldehído	10.71	12.69	10.93	14.47	16.66	16.52	16.43	18.84	17.55	19.79	17.30	16.13	12.64	10 a 20
vainillina / ácido p-hidroxibenzóico	61.57	73.92	68.81	85.90	131.70	200.55	145.92	229.29	334.99	427.26	253.07	286.73	161.88	40 a 110
vainillina / ácido vainillínico	35.21	31.54	35.50	28.07	31.13	37.22	27.45	28.85	33.43	31.14	24.35	27.29	19.23	12 a 29
ácido p-hidroxibenzóico / p-hidroxibenzaldehído	0.17	0.17	0.16	0.17	0.13	0.08	0.11	0.08	0.05	0.05	0.07	0.06	0.08	0.15 a 0.35
ácido vainillínico / p-hidroxibenzaldehído	0.30	0.40	0.31	0.52	0.54	0.44	0.60	0.65	0.52	0.64	0.71	0.59	0.66	0.53 a 1.50

 Dentro de rango

Cuadro 6. Cocientes de compuestos fenólicos en vainilla beneficiada.

Cocientes					
	vainillina/p-hidroxibenzaldehído	vainillina/ácido p-hidroxibenzóico	vainillina/ácido vainillínico	ácido p-hidroxibenzóico/p-hidroxibenzaldeído	ácido vainillínico/p-hidroxibenzaldehído
Vainilla beneficiada	13.77	168.42	16.24	0.08	0.85
Cocientes esperados	10 a 20	40 a 110	12 a 29	0.15 a 0.35	0.53 a 1.50

La vainilla beneficiada de manera artesanal está dentro del intervalo en tres de los cocientes esperados especificados para la vainilla de Madagascar. Es importante mencionar que menos del 50 % de los lotes muestreados de vainilla clasificada como rojas cumplen los cocientes, lo cual significa que estos valores no reflejan totalmente la autenticidad y calidad, por lo que se debe tener cuidado en su uso y la calidad que determinan (Gassenmeier *et al.*, 2008).

En el caso del cociente vainillina/ácido *p*-hidroxibenzóico está por arriba del valor máximo y en el cociente ácido *p*-hidroxibenzóico/*p*-hidroxibenzaldehído está por abajo del valor mínimo, Gassenmeier *et al.* (2008) reportan estas desviaciones para vainilla de Madagascar, los valores obtenidos de los cocientes en las muestras de vainilla beneficiada artesanalmente parecen indicar que durante el proceso de curado o beneficiado se forma poco ácido-*p*-hidroxibenzóico. Ninguno de los criterios analíticos está directamente relacionado con las propiedades sensoriales de los extractos de silicuas de vainilla, por lo que el enfoque sobre parámetros seleccionados lleva al desarrollo de productos especializados (Gassenmeier *et al.*, 2008).

Por otro lado, una vez obtenida la vainilla beneficiada (Figura 39) es importante mantener la calidad hasta el mercado final, por lo que se han realizado estudios en cuanto al manejo postcosecha de la vainilla beneficiada, en donde se ha empleado el empaque al vacío, sin embargo, se debe considerar que este empaque no considera la volatilización de compuestos indeseables los cuales desaparecen en el acondicionamiento tradicional y almacenamiento de las silicuas, en segundo lugar en el interior del empaque se crea una atmósfera anaeróbica que puede ocasionar el desarrollo de microorganismos y por último la atmósfera pobre en oxígeno evita reacciones oxidativas no enzimáticas lo que puede contribuir al sabor en el acondicionamiento y almacenamiento. Los factores críticos en la calidad organoléptica y microbiológica de la vainilla son el contenido

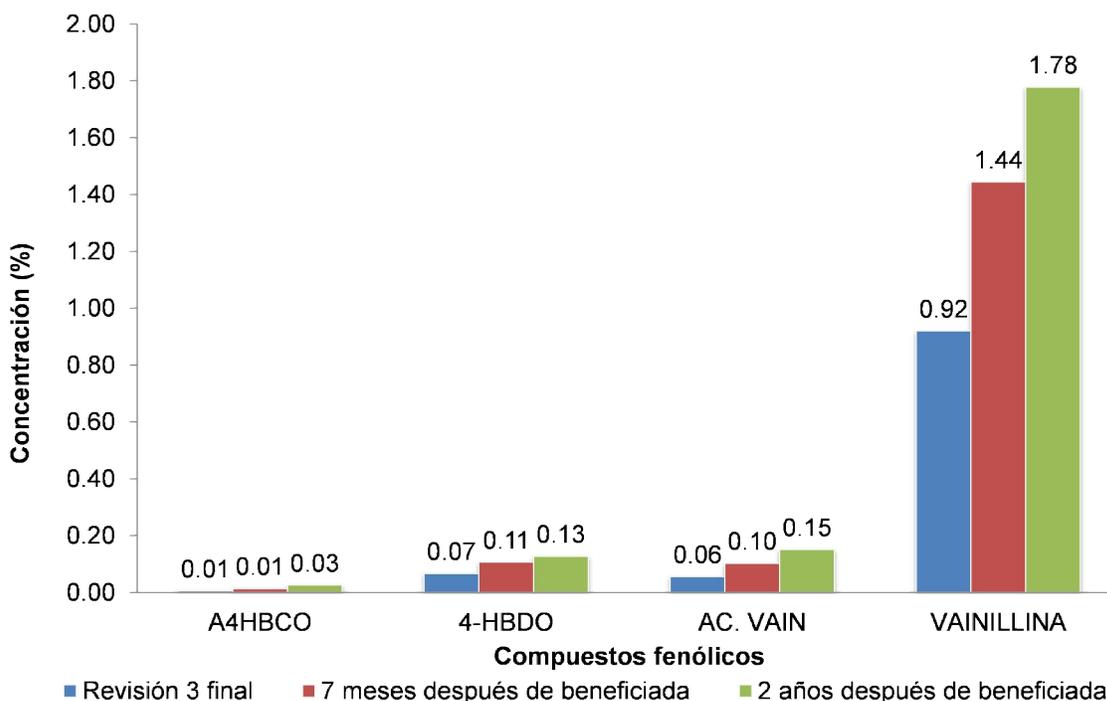
de humedad, temperatura, composición del gas de la atmósfera ambiental y el tipo de contenedor (Havkin-Frenkel, 2010).



Figura 39. Silicuas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) beneficiada.

Se realizó una evaluación de compuestos fenólicos después de 7 meses y de una muestra de 2 años (Figura 40), obteniéndose lo siguiente:

Comparación de compuestos fenólicos en almacenamiento



AA4HBCO: ácido 4-hidroxibenzoico; 4-HBDO: 4-hidroxibenzaldehído; AC.VAIN: ácido vainillínico; VAINILLINA: Vainillina.

Figura 40. Comparación de compuestos fenólicos de vainilla beneficiada (revisión 3 al final del proceso), 7 meses y 2 años de almacenamiento.

En el caso del compuesto fenólico ácido 4-hidroxibenzóico no hay formación con el tiempo, como se mencionó anteriormente, en los compuestos fenólicos 4-hidroxibenzaldehído y ácido vainillínico el aumento es poco comparado con la vainillina que aumenta de 0.9 a 1.8 %, este es un dato importante ya que el precio se fija en relación a la vainilla recién beneficiada y los resultados muestran que el proceso de beneficiado con la hidrólisis de compuestos fenólicos continúa, en específico la vainillina que es el indicador comercial para fijar el precio. Debido a que el lote empleado para la investigación se consideró que fuera homogéneo en tamaño y grado de madurez, los ciclos de sudado – secado al sol fueron de 15 y no 30 como se mencionó que llega a ocurrir de manera tradicional.

VI. CONCLUSIONES

- En casi todo el proceso de beneficiado tradicional o artesanal se tiene carga microbiana que excede los valores permitidos por la normatividad, con una disminución a partir del Sudor No. 10 para bacterias y Sudor No. 15 para mohos y levaduras.
- Los géneros que pueden estar involucrados y que afectan la salud humana son principalmente *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Aerobacter* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp.
- Las etapas del proceso que se consideran críticas son el matado en el que se debe analizar el número de usos del agua para evitar contaminación cruzada y el depósito provisional, en el cual se debe controlar el contenido de agua de las silicuas.
- El proceso de beneficio de vainilla está basado en métodos de conservación de alimentos como son la deshidratación, destrucción térmica de microorganismos, concentración de solutos, fermentación, lo cual permite disminuir e inhibir el desarrollo de microorganismos. Sin embargo, dadas las condiciones climáticas y de manejo del producto puede haber contaminación microbiana y contaminación cruzada.
- Para la calidad organoléptica es importante controlar el secado, ya que puede originar diferentes calidades o tipos de silicua en tamaño, humedad, contenido de compuestos aromáticos y de sabor, principalmente vainillina. Asimismo dado que depende de las condiciones climáticas, las silicuas se exponen a la contaminación microbiana.
- El beneficiado artesanal permite obtener vainilla con un porcentaje de vainillina de 0.9 %, que se encuentra dentro del intervalo reportado por varios autores.
- El proceso de beneficiado de vainilla es lento debido a las reacciones enzimáticas y químicas que tienen lugar, lo que lleva a un número ilimitado

de pasos alternos de sudado-secado al sol, dado que se tiene dependencia de las condiciones climáticas, esto puede optimizarse controlando la temperatura, humedad y tiempo en cada etapa.

- En cuanto al número de ciclos de secado y sudado, en este trabajo se realizaron 15 sudores de los 30 que normalmente se realizan, esto debido a la uniformidad del lote en tamaño y grado de madurez. Por lo que una opción para optimizar el proceso es usar lotes homogéneos desde el inicio del proceso.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Es importante controlar la madurez de las silicuas verdes a la cosecha, el contenido de agua de las silicuas beneficiadas, las condiciones higiénicas postcosecha y el almacenamiento (temperatura, humedad, composición de gases así como el tipo de empaque).

- ✓ Realizar un estudio más detallado del desarrollo de compuestos fenólicos después del beneficiado de la vainilla, para confirmar el aumento de dichos compuestos en almacenamiento (después del depósito provisional) que puedan servir al productor para negociar el precio de la vainilla, asimismo considerar la humedad de la misma para evitar una percepción errónea del contenido de vainillina en vainas procesadas.

- ✓ Realizar un proceso de beneficiado considerando las condiciones controladas, como son tiempo de almacenamiento de tres días antes del matado; matado en agua caliente 63 °C / 5 min ó 65 °C / 3 min, sudado 45-65 °C y alta humedad por un tiempo aproximado de 8-12 h, esto para mostrar al beneficiador artesanal que se pueden mejorar las características de la vainilla beneficiada que le permitirán acceder a un mayor precio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Anandaraj M., Rema J., Sasikumar B. y Suseela B.R. 2005. Vanilla (extensión pamphlet). Consultado el 07 de febrero de 2011 en la página electrónica: <http://www.spices.res.in/package/vanilla.pdf>
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria), 2002. Revista mensual. Publicado en enero de 2002. pp. 3-16.
- Brillouet Jean-Marc y Odoux E. 2010. In vivo kinetics of β -glucosidase towards glucovanillin and related phenolic glucosides in heat-treated vanilla pod (*Vanilla planifolia*, Orchidaceae). *Fruits*. 65:85-95.
- Brock T.D. 1978. Biología de los microorganismos. Editorial Prentice-Hall. 2ª ed. España. 774p.
- De la Cruz M.J., Rodríguez J.G.C. y García H.S. 2009. Vanilla: Post-harvest Operations. 50 p.
- Dignum, M. J.W.; Kerler, J., Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.* 79: 165–171.
- Dignum, M.J.W., van der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., and Verpoorte, R. 2004. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry* 85:199-205.
- FAOSTAT, 2011. Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Página electrónica: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- Font Quer P. 1980. Plantas medicinales El discórides renovado. 6ª edición. Editorial Labro S.A. España. pp:950-955.
- Font Quer P. 2001. Diccionario de Botánica. 2ª edición. Ediciones Península S.A. España. 1244 p.
- Frazier W.C. 1976. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. España. 512 p.

- Gassenmeier K., Riesen B. y Magyar B. 2008. Commercial quality and analytical parameters of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) from different origins from the 2006-2007 crop. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 194-201.
- Havkin-Frenkel D., French J.C., Graft N.M., Joel D.J., Park F. E. y Frenkel C. 2004. Interrelation of Curing and Botany in vanilla (*Vanilla planifolia*) bean. *Acta Hort.* 629. 93-102.
- Havkin-Frenkel, D. 2005. New uses for vanilla. In: *Vanilla 2005 México. Third International Congress: Back to the Origins of Vanilla*. Veracruz, Ver., México. (Power Point Presentation in CD-ROM).
- Havkin-Frenkel D.; Belanger C., F. 2007. Application of Metabolic Engineering to vanillin biosynthetic pathways in *Vanilla planifolia*. Verpoorte, R.; Alfermann, A.W.; Johnson, T.S. (Eds). Springer. pp. 175-196.
- Havkin-Frenkel, D. y Frenkel C. 2010. Post Harvest of Cured Vanilla Beans. The State University of New Jersey, NJ, USA. 24 p.
- Hernández H. J., Sánchez M.S., Curti D.E. y Larios R.H. 2010. La producción de vainilla en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 1ª edición. Veracruz, México. 162 p.
- Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P.R. y Rathod V.K. 2009. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J. Food Eng.* 93: 421-426.
- Kanisawa T. 1993. Flavor development in vanilla beans. *Kouryou* 180:113-123.
- Kishor Kumar, K.; Arul AnanthaKumar, A.; Ahmad, R., Adhikari, S., Variyar, P.S., Sharma, A. 2010. Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cure vanilla beans (*Vanilla planifolia*). *J. Agric.Food Chem.* 122: 841-845.
- Krishnakumar V., Bindumol G. P., Potty S. N. y Govindaraju C. 2007. Processing of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) beans - Influence of storing fresh beans, killing temperature and duration of killing on quality parameters. *J. Spices Aromatic Crops. India*. Vol. 16 (1): 31-37.

- Lubinsky P., Séverine B., Hernández H.J., Seung-Chul K. y Gómez-Pompa A. 2008. Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). Economic Botany. Vol. 62 (2): 127-138.
- Márquez O., Waliszewski K.N. Oliart R.M., Pardo V.T. 2008. Purification and characterization of cell Wall-bound peroxidase from vanilla bean. Food Sci. Technol. 41:1372-1379.
- NMX-FF-074-SCFI-2009, 2009. Norma Mexicana Productos no industrializados para uso humano – vainilla – (*Vanilla fragans* (Salisbury) Ames – Especificaciones y métodos de prueba. 38 p.
- NOM-092-SSA1-1994, 1994. Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. 5 p.
- Odoux E., Escoute J., Verdeil J.L. y Brillouet M. 2003. Localization of β -D-Glucosidase Activity and Glucovanillin in Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews). Annals Botany. 92: 437-444.
- Odoux E. y Grisoni M. 2011. Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Taylor & Francis Group. E.U.A. 368 p.
- Palamas L., T.; Khatib A.; Choisis H., Y.; Payet B.; Fock I.; Verpoort R.; Kodja H. 2009. Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. J. Agric. Food Chem. 57: 7651-7658.
- Paredes U., A.M. 2007. Desarrollo e implementación del manual de buenas prácticas de manufactura para el beneficio de vainilla Global Fungi S.P.R. de R.L. Tesis. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp.12-16.
- Pérez-Silva, A; Odoux, E., Brat, P. Ribeyre, F., Rodríguez-Jimenez, G, Robles-Olvera, V., García Alvarado, M.A., Gunata, Z. 2006. GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. Food Chem. 99: 728–735.

- Pérez S.A., Gunata Z., Lepoutre J.P. y Odoux E. 2011. New insight on the génesis and fate of odor-active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Res.Int.* 44: 2930-2937.
- Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. 2002. *Microbiología*. 5a edición. McGraw-Hill Companies, Inc. España. 1240 p.
- Ranadive, A. S. 1992. Vanillin and related flavour compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *J. Agric. Food Chem.* 40:1922–1924.
- Reyes L.D., Rodríguez M.B., Kelso B.H.A., Huerta L.M. e Ibáñez M.A. 2008. Beneficio tradicional de vainilla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 72 p.
- Rodríguez, M. V. 2010. Beneficiado tradicional de vainilla. Comunicación personal.
- Rodríguez, M. V. 2011. Pérdidas por contaminación microbiana en el Beneficiado tradicional de vainilla. Comunicación personal.
- Roling, W.F.M., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., y Van Verseveld, H.M. 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: Microbial ecology of traditional Indonesian curing. *Applied Environ. Microbiol.* 67(5):1995-2003.
- Schlüler P.M., Soto A. M.A. y Harris S.A. 2007. Genetic Variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Econ. Botany* 61(4): 328-336.
- SIAP, SAGARPA, 2011. Sistema de Información Agropecuaria. Consultado el 10 de abril de 2011.
- Sciubba L., Gioia D.Di, Fava F. y Gostoli C. 2009. Membrane-based solvent extraction of vanillin in hollow fiber contactors. *Desalination* 241: 357-364.
- Soto, A. M.A. 2003. P 321-334. *In*: Pridgeon, A.M.,P.J. Cribb, M.W. Chase and F.N. Rassmussen (eds.). *Genera Orchidacearum Vol. 3. Orchidoideae Part 2. Vainilloideae*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Soto, A. M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *CONABIO. Biodiversitas* 66: 1-9.

- Tapia-Ochoategui A.P., Camacho-Díaz B.H., Perea-Flores M.J., Ordóñez-Ruíz I.M., Gutiérrez-López G.F. y Dávila-Ortiz G. 2011. Cambios morfométricos durante el beneficio tradicional de las vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae) en México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10 (1): 105-115.
- Thomas, J., Bindumol, G. P. 2005. Microbial contamination in cured vanilla beans. *Spice India*, pp. 6, 8.
- Voisne R., Carmichael L, Chalier P., Cormier F, Morin A. 1995. Determination of glucovanillin and vanillin in cured vanilla pods. *J. Agric. Food Chem.* 43 (10): 2658-2661.
- Waliszewski K.N., Márquez O., Pardo V.T. 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chem.* 117:196-203.
- Walton N.J., Mayer M.J. y Narbad A. 2003. Molecules of Interest Vanillin. *Phytochemistry* 63: 505-515.

ANEXO A.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis por compuesto fenólico

DATA DIFTIEMPO;

DO A=1 TO 4;

DO B=1 TO 14;

DO R=1 TO 6;

COAB=10*A+B;

INPUT Y @@;

OUTPUT;

END;

END;

END;

CARDS;

.	.	0.0011	.	.	0.0087
0.0006	0.0044	0.0055	0.0040	0.0069	0.0059
0.0073	0.0032	0.0077	0.0072	0.0053	0.0064
0.0028	0.0033	0.0021	0.0050	0.0066	0.0041
0.0035	0.0036	0.0060	0.0016	0.0023	0.0025
0.0027	0.0025	0.0033	0.0020	0.0027	0.0029
0.0044	0.0073	0.0041	0.0061	0.0026	0.0048
0.0050	0.0039	0.0027	0.0068	0.0033	0.0035
0.0032	0.0028	0.0043	0.0019	0.0009	0.0045
0.0020	0.0021	0.0023	0.0041	0.0028	0.0030
0.0052	0.0036	0.0126	0.0034	0.0034	0.0082
0.0100	0.0008	0.0060	0.0097	0.0013	0.0046
0.0100	0.0075	0.0103	0.0110	0.0055	0.0073
0.0080	0.0048	0.0047	0.0061	0.0048	0.0042
.	.	0.0117	.	.	0.0442
0.0101	0.0176	0.0294	0.0304	0.0235	0.0483
0.0302	0.0329	0.0431	0.0345	0.0383	0.0541
0.0189	0.0178	0.0151	0.0364	0.0362	0.0164
0.0150	0.0268	0.0312	0.0205	0.0349	0.0264
0.0254	0.0347	0.0268	0.0365	0.0427	0.0303
0.0304	0.0522	0.0360	0.0415	0.0590	0.0423
0.0408	0.0549	0.0493	0.0451	0.0600	0.0554
0.0592	0.0658	0.0465	0.0502	0.0688	0.0465
0.0614	0.0604	0.0560	0.0676	0.0564	0.0496
0.0932	0.0975	0.0867	0.0862	0.0871	0.0811
0.1373	0.0790	0.0727	0.1370	0.0858	0.0640
0.1204	0.1015	0.1246	0.0978	0.0927	0.1231
0.0687	0.0932	0.0584	0.0593	0.0675	0.0537
.	.	0.0013	.	.	0.0157
0.0012	0.0088	0.0143	0.0085	0.0164	0.0147
0.0139	0.0076	0.0118	0.0131	0.0142	0.0113
0.0071	0.0079	0.0218	0.0116	0.0165	0.0077
0.0155	0.0245	0.0162	0.0083	0.0098	0.0085
0.0143	0.0138	0.0147	0.0157	0.0145	0.0141
0.0306	0.0266	0.0218	0.0324	0.0192	0.0260
0.0236	0.0358	0.0336	0.0269	0.0341	0.0454
0.0254	0.0391	0.0327	0.0167	0.0288	0.0342
0.0325	0.0383	0.0483	0.0486	0.0322	0.0234
0.0625	0.0698	0.0823	0.0479	0.0546	0.0609
0.0717	0.0510	0.0500	0.0710	0.0572	0.0394
0.0781	0.0694	0.0795	0.0706	0.0597	0.0766
0.0810	0.0633	0.0439	0.0601	0.0499	0.0416

.	0.1176	.	0.4805		
0.0970	0.2569	0.4051	0.3001	0.3484	0.6125
0.4153	0.3738	0.4166	0.3972	0.4641	0.4814
0.2340	0.2552	0.4607	0.3905	0.4574	0.2395
0.3225	0.6883	0.3712	0.2693	0.5744	0.3511
0.5075	0.5714	0.3763	0.6835	0.6923	0.4146
0.5091	0.7774	0.6968	0.6768	0.8430	0.7937
0.6746	1.1097	0.9619	0.7115	1.1661	1.1317
0.8596	1.2904	0.8843	0.7064	1.3285	0.8422
1.0087	1.1171	1.6270	1.1767	0.9420	1.0841
1.5898	1.9168	1.4122	1.3993	1.5667	1.3168
1.8666	1.5209	1.2340	1.8453	1.7311	1.0933
1.5504	1.3230	1.4816	1.3159	1.2156	1.4583
1.1407	1.2164	0.7159	0.9849	0.8523	0.6090

```

;
PROC glm;
CLASS B;
MODEL Y= B;
MEANS B/lines TUKEY;by A;run;
run;

```

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 1

----- A=1 -----

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
B	14	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
		Número de observaciones 84

NOTA: Due to missing values, only 80 observations can be used in this analysis.

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 2

----- A=1 -----

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	0.00020617	0.00001586	3.37	0.0005
Error	66	0.00031057	0.00000471		
Total correcto	79	0.00051674			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.398979	46.26493	0.002169	0.004689

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	0.00020617	0.00001586	3.37	0.0005

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	0.00020617	0.00001586	3.37	0.0005

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 3

----- A=1 -----

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 66
 Error de cuadrado medio 4.706E-6
 Valor crítico del rango estudentizado 4.92386
 Diferencia significativa mínima 0.0047
 Media armónica de tamaño de celdas 5.25

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	B
A	0.008600	6	13
A			
B A	0.006183	6	3
B A			
B A	0.006067	6	11
B A			
B A	0.005433	6	14
B A			
B A	0.005400	6	12
B A			
B A	0.004900	2	1
B A			
B A	0.004883	6	7
B A			
B A	0.004550	6	2
B A			
B A	0.004200	6	8
B A			
B A	0.003983	6	4
B			
B	0.003250	6	5
B			
B	0.002933	6	9
B			
B	0.002717	6	10
B			
B	0.002683	6	6

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 4

----- A=2 -----

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
B	14	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
		Número de observaciones 84

NOTA: Due to missing values, only 80 observations can be used in this analysis.

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 5

----- A=2 -----

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Y

Suma de	Cuadrado de
---------	-------------

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	0.05874753	0.00451904	25.41	<.0001
Error	66	0.01173977	0.00017788		
Total correcto	79	0.07048730			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media	
	0.833449	24.44855	0.013337	0.054551	

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	0.05874753	0.00451904	25.41	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	0.05874753	0.00451904	25.41	<.0001

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 6

----- A=2 -----

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	66
Error de cuadrado medio	0.000178
Valor crítico del rango estudentizado	4.92386
Diferencia significativa mínima	0.0287
Media armónica de tamaño de celdas	5.25

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	B
A	0.110017	6	13
A			
A	0.095967	6	12
A			
B	0.088633	6	11
B			
B	0.066800	6	14
C			
D	0.058567	6	10
D			
D	0.056167	6	9
D			
D	0.050917	6	8
D			
D	0.043567	6	7
D			
D	0.038850	6	3
D			
D	0.032733	6	6
F			
F	0.027950	2	1
F			
F	0.026550	6	2
F			

```

F          0.025800    6    5
F
F          0.023467    6    4

```

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 7

```

----- A=3 -----
                Procedimiento GLM
Información del nivel de clase
Clase      Niveles  Valores
B          14      1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
                Número de observaciones      84

```

NOTA: Due to missing values, only 80 observations can be used in this analysis.

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 8

```

----- A=3 -----
                Procedimiento GLM
Variable dependiente: Y

Fuente      DF      Suma de      Cuadrado de
Modelo      13      cuadrados      la media      F-Valor      Pr > F
Error       66      0.00476703    0.00007223    37.91        <.0001
Total correcto 79      0.04036498

```

```

R-cuadrado      Coef Var      Raiz MSE      Y Media
0.881902        25.71951     0.008499     0.033044

```

```

Fuente      DF      Tipo I SS      Cuadrado de      F-Valor      Pr > F
B           13      0.03559795     la media      37.91        <.0001
                0.00273830

```

```

Fuente      DF      Tipo III SS     Cuadrado de      F-Valor      Pr > F
B           13      0.03559795     la media      37.91        <.0001
                0.00273830

```

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 9

```

----- A=3 -----
                Procedimiento GLM

```

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

```

Alfa          0.05
Error de grados de libertad      66
Error de cuadrado medio          0.000072
Valor crítico del rango estudentizado 4.92386
Diferencia significativa mínima    0.0183
Media armónica de tamaño de celdas 5.25
NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

```

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

```

Tukey Agrupamiento      Media      N      B
A          0.072317      6      13
A
A          0.063000      6      11
A

```

	A		0.056717	6	12
	A				
	A		0.056633	6	14
	B		0.037217	6	10
	B				
	B		0.033233	6	8
	B				
C	B		0.029483	6	9
C	B				
C	B	D	0.026100	6	7
C		D			
C		D	0.014517	6	6
C		D			
C		D	0.013800	6	5
C		D			
C		D	0.012100	6	4
C		D			
C		D	0.011983	6	3
		D			
		D	0.010650	6	2
		D			
		D	0.008500	2	1

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 10

----- A=4 -----
 Procedimiento GLM
 Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
B	14	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
	Número de observaciones	84

NOTA: Due to missing values, only 80 observations can be used in this analysis.

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 11

----- A=4 -----
 Procedimiento GLM

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	14.84806598	1.14215892	29.38	<.0001
Error	66	2.56559113	0.03887259		
Total correcto	79	17.41365711			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.852668	23.09279	0.197161	0.853779

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	14.84806598	1.14215892	29.38	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	13	14.84806598	1.14215892	29.38	<.0001

Sistema SAS 14:44 Wednesday, March 10, 2013 12

----- A=4 -----

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	66
Error de cuadrado medio	0.038873
Valor crítico del rango estudentizado	4.92386
Diferencia significativa mínima	0.4237
Media armónica de tamaño de celdas	5.25

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	B
	A	1.5485	6	12
	A			
	A	1.5336	6	11
	A			
B	A	1.3908	6	13
B	A			
B	A C	1.1593	6	10
B	C			
B	D C	0.9852	6	9
	D C			
E	D C	0.9593	6	8
E	D C			
E	D C	0.9199	6	14
E	D			
E	D F	0.7161	6	7
E	F			
E	F	0.5409	6	6
	F			
	F	0.4295	6	5
	F			
	F	0.4247	6	3
	F			
	F	0.3396	6	4
	F			
	F	0.3367	6	2
	F			
	F	0.2991	2	1