

62



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“EVALUACION DE DIFERENTES PROCESOS DE EXTRACCION DE GLUCOVAINILLINA A PARTIR DE VAINA SIN BENEFICIAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ISABEL ANGELA PEREZAMADOR DEL CUETO



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

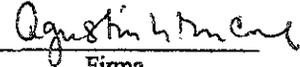
Presidente Prof. RAUL AGUILAR CABALLERO.
Vocal Prof. FRANCISCA ITURBE CHINAS.
Secretario. Prof. FRANCISCO RUIZ TERAN.
1er Suplente Prof. AMELIA MA. DE G. FARRES GONZALEZ SARAVIA.
2do Suplente Prof. LUZ SANDRA SANCHEZ DEL ANGEL

Sitio donde se desarrollo el tema Laboratorio 321 Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio "E" Facultad de Química de la UNAM.

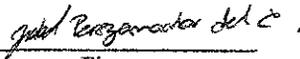
Asesor del tema: Dr. Francisco Ruiz Teran


Firma

Supervisor Técnico Dr. Agustín López-Munguía Canales


Firma

Sustentante Isabel Angela Perezamador del Cueto


Firma

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL.	4
OBJETIVOS PARTICULARES.	4
ANTECEDENTES	5
HISTORIA.....	5
REPRODUCCIÓN.....	7
ENFERMEDADES.	8
BENEFICIO O CURADO DE LA VAINILLA.	9
1.- " Matar la vaina."	10
2.- " Sudado."	10
3.- Secado.....	11
4.- Acondicionamiento.....	12
BIOQUÍMICA Y QUÍMICA.....	14
Enzimas presentes en la vaina.	14
Precusores presentes en la vaina.	15
Estudios realizados para evitar el proceso de beneficio.....	19
Compuestos responsables del aroma	21
PRODUCTOS COMERCIALES DERIVADOS DE LA VAINILLA.	25
MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS EXTRACTOS DE VAINILLA.	27
Adulteraciones.	27
COMERCIALIZACIÓN DE LA VAINILLA.....	32
En el mundo.....	32
En México.	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE VAINAS	37
Determinación de humedad.....	38
DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ABSORCIÓN DE VAINILLINA Y ETILVAINILLINA.	38
Curva patrón.	39
SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN VAINAS DE VAINILLA SIN BENEFICIAR POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN. (HPLC)	39
Condiciones finales.....	39
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA EN UN EXTRACTO DE VAINAS VERDES.	40
EXTRACCIÓN DE VAINILLINA Y GLUCOVAINILLINA.	41
Extracción alcohólica por el método soxhlet.....	41
Pretratamientos enzimáticos.....	41

<i>Extracciones alcohólicas posteriores al tratamiento enzimático</i>	45
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE VISCOZYME L Y CELLUCLAST.	45
<i>Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5</i> <i>Dinitrosalicílico (DNS)</i>	46
RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
ALMACENAMIENTO.	47
DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	47
DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ABSORCIÓN DE VAINILLINA Y ETILVAINILLINA.	48
SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN VAINAS DE VAINILLA SIN BENEFICIAR POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN. (HPLC).....	52
<i>Determinación de la fase móvil</i>	52
<i>Selección de la columna</i>	53
<i>Condiciones cromatográficas establecidas</i> :.....	53
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA EN UN EXTRACTO DE VAINAS VERDES.....	56
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.	59
EXTRACCIÓN DE VAINILLINA Y GLUCOVAINILLINA.	60
<i>Determinación del tamaño de muestra</i>	60
<i>Extracción alcohólica por el método de soxhlet</i>	61
<i>Tratamientos enzimáticos</i>	64
EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA POSTERIOR AL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.	69
<i>Tratamiento enzimático con 50g de muestra</i>	70
CONCLUSIONES	80
ANEXOS	82
ANEXO I.....	82
<i>Preparación de los estándares de etilvainillina y vainillina</i>	82
<i>Preparación de la curva patrón de vainillina y etilvainillina</i>	82
ANEXO II.....	84
<i>Preparación de la curva patrón de glucosa</i>	84
ANEXO III.....	85
<i>Determinación de la actividad específica de Celluclast</i>	85
BIBLIOGRAFÍA	88

Figura 1. A) Vainas de vainilla sin beneficiar. B) Vainilla beneficiada.	6
Figura 2. Calendario del proceso de beneficio en el que se muestran las actividades día por día de un lote de vainas.....	13
Figura 3. Reacción de hidrólisis de la glucovainillina a vainillina	14
Figura 4. Principales compuestos aromáticos responsables de las características organolépticas de la vainilla.....	22
Figura 5. Mapa de la República Mexicana, señalando los principales estados productores de vainilla.	35
Figura 6. Espectro de absorción de etilvainillina 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.076 a una longitud de onda aproximadamente de 250nm.	49
Figura 7. Espectro de absorción de p-hidroxibenzaldehido 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.798 a una longitud de onda aproximadamente de 280nm.	50
Figura 8. Espectro de absorción de vainillina 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.223 a una longitud de onda aproximadamente de 225nm.	51
Figura 9. Cromatograma los estándares de vainillina (0.06mg/ml) y de etilvainillina 0.6mg/ml elaborado con las condiciones establecidas para la creación de la curva patrón correspondiente.....	54
Figura 10. Cromatograma de un extracto de vainas sin beneficiar elaborado por el método soxhlet.....	54
Figura 11. Cromatograma de un extracto de vainas sin beneficiar elaborado por el complejo enzimático Viscozyme L, usando como solvente agua.	55
Figura 12. Perfil de un extracto obtenido por el método soxhlet a partir de vainas sin beneficiar. Una alícuota del mismo extracto es tratado con aproximadamente 1mg de Celluclast (complejo enzimático), e incubado 2 horas a temperatura ambiente. Celluclast presenta actividad β -glucosidasa, los cromatogramas se superponen para observar la hidrólisis de la glucovainillina y la formación de vainillina.	58

Tabla I. Efecto de la β -Glucosidasa en el tratamiento de vainas beneficiadas y en el contenido de vainillina Voisine (1995).....	17
Tabla II. Compuestos de vainilla beneficiada de diferentes regiones geográficas. (g/100g vaina) Ranadive (1992).....	23
Tabla III. Condiciones cromatográficas establecidas.....	40
Tabla IV. Condiciones cromatográficas establecidas.....	53
Tabla V. Determinación de actividad específica de viscozyme L, empleando como sustrato celobiosa al 0.1%, 0.15% y 0.25% a una temperatura de 45°C y un pH de 4.0.....	60
Tabla VI. Concentración de vainillina y glucovainillina (g/100g vaina seca) obtenida a partir de la extracción por soxhlet, tomando como muestra una vaina.....	62
Tabla VII. Concentración de vainillina y glucovainillina (g/100g vaina seca) obtenida a partir de la extracción por soxhlet tomando como muestra vainas homogeneizadas.....	62
Tabla VIII. Resultados de las extracciones de vainilla sin beneficiar, extracción acuosa (control) a una temperatura de 50°C y tipo soxhlet con etanol al 47.5% utilizando 2g de muestra.....	64
Tabla IX. Concentración de vainillina y glucovainillina obtenida por los métodos de macerace, viscozyme L y control, en todos los casos de usa como solvente agua y 2g de materia prima.....	66
Tabla X. Comparación de las extracciones realizadas con dos tamaños de muestra diferentes con varios métodos. Porcentaje de vainillina.....	72
Tabla XI. Comparación de las extracciones realizadas con dos tamaños de muestra diferentes con varios métodos. Porcentaje de glucovainillina.....	73
Tabla XII. Comparación de la concentración de vainillina y el valor estimado de glucovainillina presente en vaina beneficiada(Lote 3), sin beneficiar (Lote 2), y en la extracción enzimática/ alcohólica con vaina verde.....	77
Tabla XIII. Preparación de curva patrón.....	82
Tabla XIV. Áreas obtenidas a partir de las soluciones de vainillina y etilvainillina realizadas.....	83
Tabla XV. Curva Patrón.....	84
Tabla XVI. Determinación de la actividad específica de Celluclast.....	85

Gráfica 1. Resultados correspondientes a la Tabla IX. Porcentaje de vainillina extraída por diferentes métodos.	68
Gráfica 2. Resultados correspondientes a la Tabla X.Extracción de vainillina usando agua como solvente.	74
Gráfica 3. Resultados correspondientes a la Tabla X. Extracción de vainillina usando alcohol como solvente.	75
Gráfica 4. Resultados correspondientes a la Tabla XII. Extracción de vainillina y glucovainillina.	79
Gráfica 5. Resultados correspondientes a la Tabla V.Determinación de la actividad específica de Viscazyme L.	86
Gráfica 6. Resultados correspondientes a la Tabla XVI.Determinación de la actividad específica de Celluclast.	87

INTRODUCCIÓN

La vainilla es uno de los saborizantes naturales más apreciados mundialmente. Dentro de sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria se cuentan la elaboración de pasteles, helados, dulces y licores, entre muchas otras. En la industria farmacéutica su uso es frecuente en la formulación de cosméticos, perfumes y medicamentos.

Siendo la planta de la vainilla una orquídea que necesita climas muy específicos para su desarrollo, solamente crece en países ubicados entre el Trópico de Cáncer y el de Capricornio. Aunque es originaria de México actualmente la aportación de nuestro país a la producción mundial representa solamente un 0.5% (Rakotoarison 1995). Los estados de la República Mexicana donde se desarrolla este fruto son Puebla, Oaxaca, Chiapas y Veracruz, pero es necesario señalar que el cultivo de vainilla en Veracruz constituye el 85% de la producción nacional (Curti 1995). Desafortunadamente en los últimos años las cosechas no se han comercializado adecuadamente, ello debido a que los compradores son sumamente exigentes en cuanto a la calidad del producto y no todos están dispuestos a pagar el precio real que representa dicha calidad. La suma de las anteriores situaciones ha provocado una aguda crisis para los campesinos mexicanos dedicados al cultivo de la vainilla (Cruz A. 1998).

La demanda de vainilla natural aumenta constantemente, sobrepasando a la oferta y provocando con ello un elevado precio. Este escenario ha dado lugar a muchos fraudes. Uno de los más frecuentes

es reforzar el extracto natural al añadir vainillina sintética en pequeñas cantidades para no alterar el sabor y tener un aroma similar a la vainilla natural. La identificación de un extracto adulterado es compleja y sumamente costosa. Por esta razón actualmente existe un gran interés en desarrollar métodos de identificación accesibles para la industria.

El compuesto más importante de la vainilla natural es la vainillina, en función de la cual se cotiza la vaina y también sirve como prueba de su calidad. En la actualidad se han estudiado alternativas para la obtención de vainillina, por ejemplo, las biotransformaciones o el cultivo de tejidos vegetales (Westcott 1994). Estos métodos permiten la reducción de costos en la producción. Sin embargo las características que tiene la vainilla natural no se han podido reproducir por lo que ésta continua presentando una demanda muy alta en el mercado mundial.

La producción natural del fruto no es fácil, por el contrario es compleja puesto que requiere de grandes cuidados como lo es la polinización manual de las flores, además del curado o beneficio, que hasta la fecha se realiza en forma artesanal.

Este proceso llamado beneficio tiene una duración de tres meses aproximadamente. En él se han observado bajos rendimientos debido a pérdidas por contaminación con hongos o a la ineficiencia en la transformación de precursores presentes en el fruto (Ranavide 1992). Los estudios han comprobado que en la vaina verde se encuentra la glucovainillina, la cual es la precursora de la vainillina. Durante el

proceso de curado este glucósido es hidrolizado por medio de la β -glucosidasa, obteniendo así la vainillina.

Dado lo anterior es posible apreciar como la producción de vainilla requiere de una gran cantidad de mano de obra, además de un largo tiempo de maduración para lograr vainas con un buen contenido de vainillina. Los vainilleros en México han disminuido su producción debido a factores tales como la alta competitividad de los mercados internacionales, los procesos sintéticos, así como por la ineficiencia en la obtención de la vainilla.

La importancia que se le quiere dar a este estudio se basa en la aplicación de posibles modificaciones al proceso vigente con las cuales se podrían disminuir los tiempos de producción y mejorar la eficiencia en la recuperación de vainillina.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Desarrollar un método enzimático de extracción de glucovainillina a partir de vainas verdes sin beneficiar, para su posterior transformación enzimática a vainillina.

Objetivos particulares.

- Determinar las condiciones para la extracción enzimática eficiente de glucovainillina.
- Determinar la eficiencia de la transformación de glucovainillina a vainillina utilizando enzimas comerciales con actividad β -glucosidasa.

ANTECEDENTES

Historia.

La vainilla es originaria de México y Centroamérica, los Aztecas la utilizaban como aromatizante de bebidas y como moneda, posteriormente los españoles propagaron su cultivo en regiones tropicales, dándola a conocer en Europa hacia finales del siglo XVI. Se empezó a cultivar en Indonesia sin éxito puesto que la planta no producía fruto alguno, tiempo después se implementó la polinización manual, se desarrollaron diferentes técnicas, para poder realizar este paso de una manera más eficiente y rápida, y por lo tanto aumentar la producción del fruto, hasta que en el siglo XIX se rompió el monopolio de la vainilla que mantenía México siendo actualmente Madagascar uno de los principales productores.

Características de la vainilla.

La planta de la vainilla es una orquídea que crece en clima tropical y pertenece a la familia *Orchidaceae*; la vainilla es la única de las orquídeas cuyo fruto tiene gran importancia como saborizante, por lo que tiene un gran valor comercial.

Hay numerosas especies de orquídeas, pero la de mayor importancia económica es la *Vanilla fragrans* o *Vanilla planifolia* (Ranadive 1992). Otras especies de menor importancia comercial son la *Vanilla tahitensis* y *Vainilla pompona*, las cuales tienen

características distintas en cuanto al sabor y aroma (Ramaroson-Roanizafinimanana et al 1997).

Los países productores de *Vanilla planifolia* son: México, Madagascar, Indonesia, la isla Reunión, las islas Comores (islas Bourbon), Java, Sri Lanka, Islas Scheilles, Mauricio, Guadalupe, Tahití, Filipinas, Hawai y algunos países de África.

Esta orquídea es nativa de México y Centroamérica y se distribuye en bosques tropicales húmedos desde el nivel del mar hasta aproximadamente 1,000m de altitud. La vainilla prospera en zonas de clima cálido húmedo con una temperatura media anual de 22 a 25°C y una humedad relativa superior al 80%. Requiere una temporada lluviosa superior a 2,000mm de precipitación aproximadamente y un periodo seco de tres meses al año.

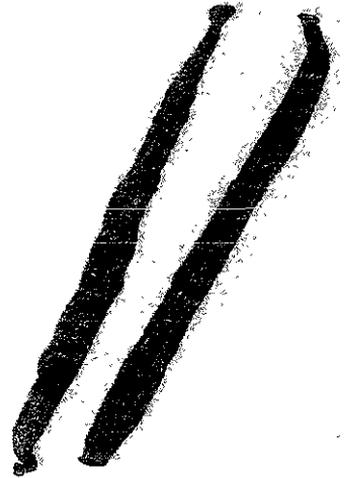


Figura 1. A) Vainas de vainilla sin beneficiar. B) Vainilla beneficiada.

Reproducción.

La vainilla necesita de árboles tutores para su crecimiento, estos tienen la función de sostener a la planta y de proporcionarle la sombra necesaria para su desarrollo. Las especies de árboles tutores más utilizadas como sostén son naranjales viejos, algunas leguminosas, como son los árboles conocidos comúnmente como Pichoco o Colorín (*Erythrina sp.*) y Cocuite (*Gliricidium sepium*). Una vez sembrado el soporte, en cuanto pueda proporcionar la sombra necesaria se planta un bejuco, que al llegar a una determinada altura se encausa para que regrese al suelo. Este procedimiento se repite 3 ó 4 veces lo que permite que la planta obtenga los nutrientes necesarios para la cantidad de follaje formado.

En México el periodo de floración de *V. planifolia* abarca de marzo a mayo, abriéndose una flor por día y ocasionalmente dos, esta vive aproximadamente de seis a ocho horas.

La primera floración ocurre después de 2 ó 3 años de plantado el bejuco, los polinizadores son atraídos por el néctar que se produce en la base del labelo (pétalo basal modificado) y por el aroma dulce de sus flores. El polinizador natural de las flores de *V. planifolia*, se ha reportado que puede ser la abeja melipora o colibríes. Debido a la estructura de la flor la polinización natural es difícil que ocurra, por lo que esta se realiza de forma manual.

Es importante controlar el número de flores polinizadas por maceta, ya que a mayor cantidad de frutos menor será su vida útil. En general una planta vigorosa de 4 años o más podría soportar 40 frutos en condiciones de temporal.

En las poblaciones naturales la producción de frutos es muy baja, por lo que se sugiere que los polinizadores son poco eficientes. Los frutos presentan forma de cápsulas lineales cilíndricas, aplastadas al exterior, miden entre 18 y 25cm de largo y 18mm de diámetro. Los frutos inmaduros tienen un gran porcentaje de agua y no contienen ni aroma ni sabor. Estos maduran en un periodo que fluctúa entre 9 y 10 meses, cada uno contiene en el interior miles de semillas pequeñas de forma esférica con un color negro brillante. La cosecha se realiza cuando se aprecia al tacto el reblandecimiento del fruto y el color cambia de verde brillante a verde amarillento. Este cambio se aprecia en el tiempo antes mencionado. El porcentaje de humedad del fruto es del 82 al 85% y además el contenido de azúcares aumenta conforme el fruto madura (Ranavide 1994).

Enfermedades.

El cultivo de la vainilla requiere de muchos cuidados ya que es muy susceptible a enfermedades como la pudrición de la raíz, debida a **Fusarium**, **Antracnosis**, entre otras. Estas enfermedades pueden ser ocasionadas por lluvias excesivas y prolongadas, un drenaje inadecuado o demasiada sombra de los árboles tutores. Por otra

parte, puede haber debilitamiento del fruto debido a corrientes de aire; demasiada exposición directa al sol, ocasionando que la planta y el fruto sean más susceptibles al ataque de hongos y dando como resultado pérdidas en la producción.

Se pueden presentar también algunas plagas como la chinche roja, el gusano peludo, caracoles y babosas.

Beneficio o curado de la vainilla.

El proceso donde se van a desarrollar las propiedades organolépticas del fruto maduro de la vainilla recibe el nombre de beneficio. En esta etapa las vainas absorben calor y exudan grasas (Curti 1995), las cuales se combinan con resinas naturales sirviendo de sustrato a las enzimas (Riley 1989).

La vaina madura es transportada a la planta beneficiadora, se inicia el despezonado, es decir se separan los frutos del raquis. Posteriormente los frutos se clasifican de acuerdo a sus características físicas para dar inicio al curado.

Existen varios métodos para llevar a cabo el beneficio, los cuales se aplican en los países productores de vainilla, entre ellos se encuentran el de Madagascar, las islas Bourbon, las islas Guadalupe, Puerto Rico y México. Todos ellos están conformados por cuatro pasos, los cuales se explican a continuación.

1.-“ Matar la vaina.”

Esta etapa del proceso se realiza horneando o escaldando la vaina, lo que permite detener su función respiratoria destruyendo la membrana y pared celular, causando la muerte fisiológica. Sin embargo, es importante mantener la actividad enzimática necesaria para llevar a cabo el beneficio ya que durante éste, algunas enzimas entran en contacto con sus sustratos.

En México se coloca un petate y sobre éste una cobija donde se acomodan las vainas, las que se rocían con agua. Posteriormente se empacan haciendo una “maleta”, la cual se introduce al horno. En algunas ocasiones las vainas se colocan en cajones de madera perforados en la parte inferior para permitir el drenado del agua. El horneado tiene una duración de 24 a 48 horas a una temperatura entre 60 y 65°C.

2.-“ Sudado.”

Durante el “sudado” la humedad disminuye reduciéndose el riesgo de contaminación y manteniendo la actividad enzimática necesaria. Es importante el manejo del fruto ya que si la actividad de las enzimas no es la óptima el producto no alcanzará la calidad adecuada. En este punto se hidrolizan los precursores glucosilados de los compuestos aromáticos, siendo la hidrólisis de la glucovainillina la que determinara la calidad del producto final.

Al mismo tiempo se lleva a cabo la oxidación de polifenoles, se forman ésteres, éteres y resinas. Los azúcares y ácidos orgánicos son metabolizados. Se desarrollan las características de color, aroma y sabor.

El sudado se lleva a cabo inmediatamente después del horneado (o de "matar la vaina"), colocando las vainas en cajones de madera y envolviéndolos con petates en un periodo de 7 a 10 días.

3.- Secado.

En este punto las vainas son aromáticas y de color café; después del sudado tienen una humedad de entre el 60 y 70%. Esta se va a reducir para evitar una contaminación microbiana, y permitir que se lleven a cabo cambios bioquímicos. Terminando el secado las vainas presentarán una humedad de entre el 25 y el 30%.

El secado se realiza en los tendales (patios), los cuales se cubren con petates y en ellos se colocan las vainas de 4 a 6 horas. Se realizan entre 11 y 25 asoleadas durante el beneficio, en esta etapa la concentración de vainillina aumenta, y su incremento es más eficiente cuando se realizan dos asoleadas consecutivas.

4.- Acondicionamiento.

Las vainas se almacenan en cajas de madera. En este punto se llevan a cabo reacciones de esterificación, eterificación y degradación oxidativa, produciéndose compuestos aromáticos que determinaran la calidad de la vainilla.

Posteriormente las vainas se depositan en lugares amplios y aislados donde se revisa periódicamente que estén libres de enfermedades, además de verificar el contenido de humedad, aceites y aromáticos.

En ocasiones, cuando el fruto no esta en condiciones adecuadas de humedad se asolea una vez más y finalmente la vaina entera se clasifica de acuerdo a su color, firmeza y longitud. Normalmente se obtiene un rendimiento de cinco a uno, es decir, por cada cinco kilos de vaina verde se obtiene un kilo de beneficiada.

La calidad de la vainilla está en función de la concentración de vainillina, y esta a su vez depende de las características iniciales de la planta, del grado de maduración, condiciones del curado y del origen geográfico (Ranavide et al 1983).

A continuación se presenta un calendario del proceso de beneficio mostrando cada uno de los pasos a seguir para su realización.

(Figura 2)

Semana 1		→	Semana 2		→	Semana 3	
Día	Actividad		Día	Actividad		Día	Actividad
1	Corte		8	Sol 4		15	Reposo
2	Despezonado		9	Reposo		16	Reposo
3	Horneado.		10	Sol 5, Sudado		17	Sol 9, Sudado
4	Sudor 1		11	Sol 6		18	Reposo
5	Sol 1		12	Sol 7		19	Reposo
6	Sol 2		13	Sol 8		20	Oreado
7	Sol 3		14	Reposo		21	Sol 10
Semana 4		→	Semana 5		→	Semana 6	
Día	Actividad		Día	Actividad		Día	Actividad
22	Sol 11		29	Ventilado, reposo		36	Reposo
23	Reposo, Ventilado		30	Ventilado, reposo		37	Reposo
24	Sol 12, Sudado		31	Oreado		38	Reposo
25	Oreado		32	Reposo		39	Reposo
26	Sol 13		33	Oreado, Reposo		40	Reposo
27	Sol 14		34	Sol 15, sudado		41	Sol 16
28	Reposo		35	Reposo		42	Sol 17
Semana 7		→	Semana 8		→	Semana 9	
Día	Actividad		Día	Actividad		Día	Actividad
43	Oreado		50	Oreado		57	Oreado
44	Reposo		51	Sol 21		58	Oreado
45	Reposo		52	Oreado, Reposo		59	Sol 25
46	Sol 18		53	Oreado, Reposo		60	Oreado
47	Oreado		54	Sol 22		61	Clasificación
48	Sol 19		55	Sol 23		62	Clasificación
49	Sol 20		56	Sol 24		63	Clasificación
Semana 10							
Día	Actividad						
64-100	Acondicionado						

Figura 2. Calendario del proceso de beneficio en el que se muestran las actividades día por día de un lote de vainas.

Bioquímica y Química.

Enzimas presentes en la vaina.

El fruto de la vainilla contiene proteinasas, glucosidasas, peroxidadas y polifenoloxidasas (Wild Altamirano 1969). Durante la maduración se ha observado que la actividad proteolítica disminuye y el resto de las enzimas aumenta. La β -glucosidasa y la β -galactosidasa tienen actividades específicas durante la maduración, en especial la β -glucosidasa juega un papel importante durante el beneficio después de "matar la vaina".

La β -glucosidasa hidroliza la glucovainillina para dar lugar a la vainillina, la cual es el compuesto más importante de la vaina, y determina su calidad.

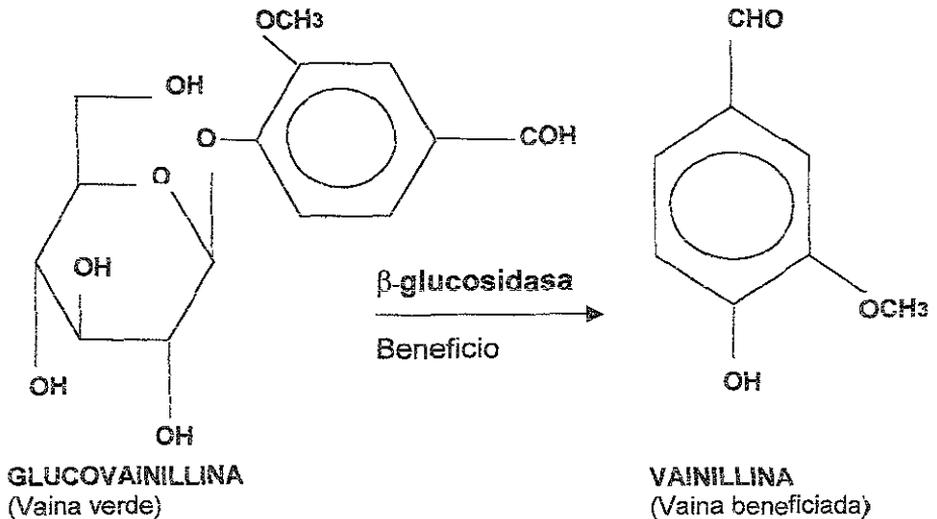


Figura 3. Reacción de hidrólisis de la glucovainillina a vainillina

Arana (1944) realizó un estudio comparativo entre los diferentes métodos de curado de las vainas de vainilla y la calidad de las mismas, en él determinó que está relacionada la calidad con la química del beneficio. Los factores que intervienen son la humedad, contenido de glucovainillina, vainillina y fenol, así como las actividades de las enzimas glucosidasa y peroxidasa (Wild Altamirano 1969). La actividad de la polifenoloxidasa y de la glucosidasa aumentan con el tiempo y a juzgar por el color final del producto es probable que exista una intensa actividad oxidativa a lo largo del curado de las vainas.

Durante el beneficio y el periodo de acondicionamiento se llevan a cabo numerosas reacciones donde se forman compuestos aromáticos y no aromáticos, ácidos orgánicos, alcoholes, azúcares libres, entre otros; dando lugar a los precursores de la esterificación y eterificación, oxidaciones y formación de bases de Schiff. Se cree que algunas de estas reacciones continúan en los extractos alcohólicos, por lo que la calidad de los mismos aumenta con el tiempo.

Precursores presentes en la vaina.

La vainillina contribuye a las características de aroma y sabor en conjunto con otros compuestos como el ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico, vainillil alcohol, y p-hidroxibenzilalcohol; los cuales se encuentran igualmente en forma de glucósidos en el fruto verde (Goris 1947 y Leong et a 1989). Sin embargo el ácido vainillínico solamente se ha encontrado en forma de glucósido en vainilla sin beneficiar originaria de Bourbon (Sagrero

Nieves y Schwartz 1988). De estos glucósidos Leong et al (1989), confirmaron la presencia del ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico y vainillina en forma de glucósidos en vainas de Bourbon, sin embargo estos compuestos no fueron encontrados en vainas de Jamaica y Costa Rica.

Ranavide et al (1992) observaron que los frutos inmaduros contienen cantidades insignificantes de glucovainillina (0.35% en vainas secas al 10% de humedad) después de cinco meses de la polinización. Sin embargo, el contenido de vainillina libre no es mencionado. Arana (1943), encontró trazas de vainillina libre en vainas verdes (cuando todavía presentan un color amarillo en la planta), mientras que el contenido de glucovainillina presente en vainas verdes maduras era superior al 8.8%.

El mecanismo de la biosíntesis de la glucovainillina en la planta no se conoce perfectamente aunque, se cree que puede provenir del ácido ferúlico el cual es β -oxidado a vanilloil-CoA, que a su vez puede ser reducido a vainillina o se puede formar el ácido vainillínico por medio de una deciclase. Se ha propuesto que una reacción similar a la β -oxidación de ácidos grasos. (Funk y Brodelius, 1990).

La concentración de vainillina reportada tanto en vainas como en el extracto se encuentra entre el 0.3-3% (Ranavide 1994). Es importante verificar la concentración a la cual se realizó el extracto puesto que no todos los autores lo elaboran de la misma forma y no lo

reportan igual, por lo que los valores pueden ser vagos y crear confusión.

En el caso de la glucovainillina tampoco se especifica la manera en la cual se calcularon las concentraciones.

Existen factores que influyen en el contenido de vainillina del fruto como pueden ser la región geográfica, el tipo de beneficio o la concentración de β -glucosidasa presente.

Voisine (1995), realizó un experimento en el cual le agregó β -glucosidasa a vainas beneficiadas, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla I. Efecto de la β -Glucosidasa en el tratamiento de vainas beneficiadas y en el contenido de vainillina Voisine (1995).

Origen de la vaina	Vainillina g / 100g vaina	
	Control	Tratamiento con β -glucosidasa
Madagascar	1.71	1.82
Tonga	1.47	1.65
Jamaica	2.29	2.85
Tahiti	0.80	0.80

Por medio del experimento realizado por Voisine (1995) se puede observar que las enzimas endógenas presentes en la vaina no son suficientes para hidrolizar a los glucósidos de la vainilla durante el curado o beneficio, por lo que la concentración de vainillina en la vaina o en los extractos elaborados podría ser mayor, puesto que al agregar la enzima a la vaina beneficiada el contenido de vainillina aumentó en un rango entre el 0 al 19.64% dependiendo del origen de la materia prima, siendo en promedio 9.135 ± 0.43 %.

Ranadive et al (1983) reportaron concentraciones insignificantes de glucovainillina en vainas inmaduras (0.35% en base seca en vainas con 10% de humedad). Sin embargo 5 meses después de haber polinizado la flor, la concentración de este compuesto era del 6.3%; debemos de considerar que el fruto llega al punto de maduración después de 8 meses, en este periodo Arana (1943) reporta trazas de vainillina en el fruto y arriba de un 8.8% de glucovainillina.

Debido a lo anterior se puede decir que si se lograra hidrolizar a toda la glucovainillina presente en la vaina, podríamos obtener concentraciones entre el 6.3-8.8% de vainillina (en vainas con 10% de humedad). Estos valores serían variables según la madurez y origen geográfico.

Estudios realizados para evitar el proceso de beneficio.

Como se mencionó anteriormente, durante el beneficio se van a desarrollar los compuestos responsables del aroma. Sin embargo se presentan algunas desventajas durante la realización del curado, dentro de las que destacan las siguientes:

- Un largo tiempo de elaboración (2 a 3 meses).
- Existen riesgos de contaminación por hongos lo que deteriora la calidad del producto.
- La hidrólisis ineficiente de la glucovainillina, ya que se ha detectado su presencia en vainas beneficiadas.
- El hecho de que primero se debe beneficiar la vaina, y posteriormente realizar el extracto de la misma.

Por estas razones se han estudiado alternativas para evitar o hacer más eficiente este paso, con lo cual se obtengan extractos de mayor calidad; es decir con una concentración de vainillina mayor y en menos tiempo.

Brunerie (1998) desarrolló un método en el cual la vaina verde madura es tratada con un conjunto de enzimas capaces de destruir la membrana y pared celular de la vaina y al mismo tiempo hidrolizar los precursores presentes en ella. Este conjunto de enzimas esta formado por pectinasas, celulasas y hemicelulasas.

En el caso de la extracción de glucósidos de vainilla Brunerie (1998) ha reportado varios experimentos dentro del que destaca el uso de una pectinasa y una hemicelulasa con una actividad de 4455 unidades de actividad de glucosidasa por mg de vaina verde. Una unidad de actividad corresponde a la hidrólisis de una micromol de sustrato por minuto, a una temperatura de 30°C en un buffer de citratos fosfatos pH de 5.0, usando p-nitrofenil glucosido como sustrato.

En este trabajo se reporta que la vaina se incubó con la enzima a 37°C durante 25 horas obteniendo una concentración de vainillina de 6.5g/Kg de vaina (Con un porcentaje de humedad aproximadamente del 85-90%), lo cual equivale a 0.65g/100g de vaina húmeda. Si consideramos que una vaina verde tiene en promedio un 85% de humedad, la concentración de vainillina en base seca sería 4.33g/100g de vaina, lo cual representa un proceso eficiente para la elaboración de un extracto, sin embargo no se sabe el origen de la vainilla, el cual es importante para tener un parámetro de concentración promedio de la región que se trate.

Otro proceso propuesto es el reportado en la patente FR-A-2,634,979. En este se propone congelar las vainas verdes a una temperatura entre -5°C y -30°C y calentar antes de extraer los compuestos responsables del aroma, lo cual probablemente acorte el tiempo de beneficio. Al congelar la vaina se va a destruir la pared celular del fruto y disminuye la actividad enzimática. Esta operación sería equivalente a "matar la vaina".

Compuestos responsables del aroma

Existen varios factores que pueden contribuir al aroma y sabor de la vainilla como pueden ser la especie, el tipo de beneficio que ha recibido la vaina, el grado de maduración, así como la relación de los compuestos que se encuentran presentes en ella. Sin embargo no se ha podido identificar el papel que cada compuesto juega en las diferentes características de cada especie.

En general en la vaina podemos encontrar azúcares, proteínas, celulosa, lignocelulosa, fibra, ácidos orgánicos, ceras, resinas, gomas, pigmentos, compuestos aromáticos y aceites esenciales.

Se han identificado más de 170 compuestos aromáticos en vainas de Madagascar (Klimes y Lamparasky 1976), siendo el más abundante la vainillina; en menores proporciones podemos encontrar al ácido p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, p-metoxibenzaldehído, ácido vainillínico, p-hidroxibenzil alcohol y vainillil alcohol.

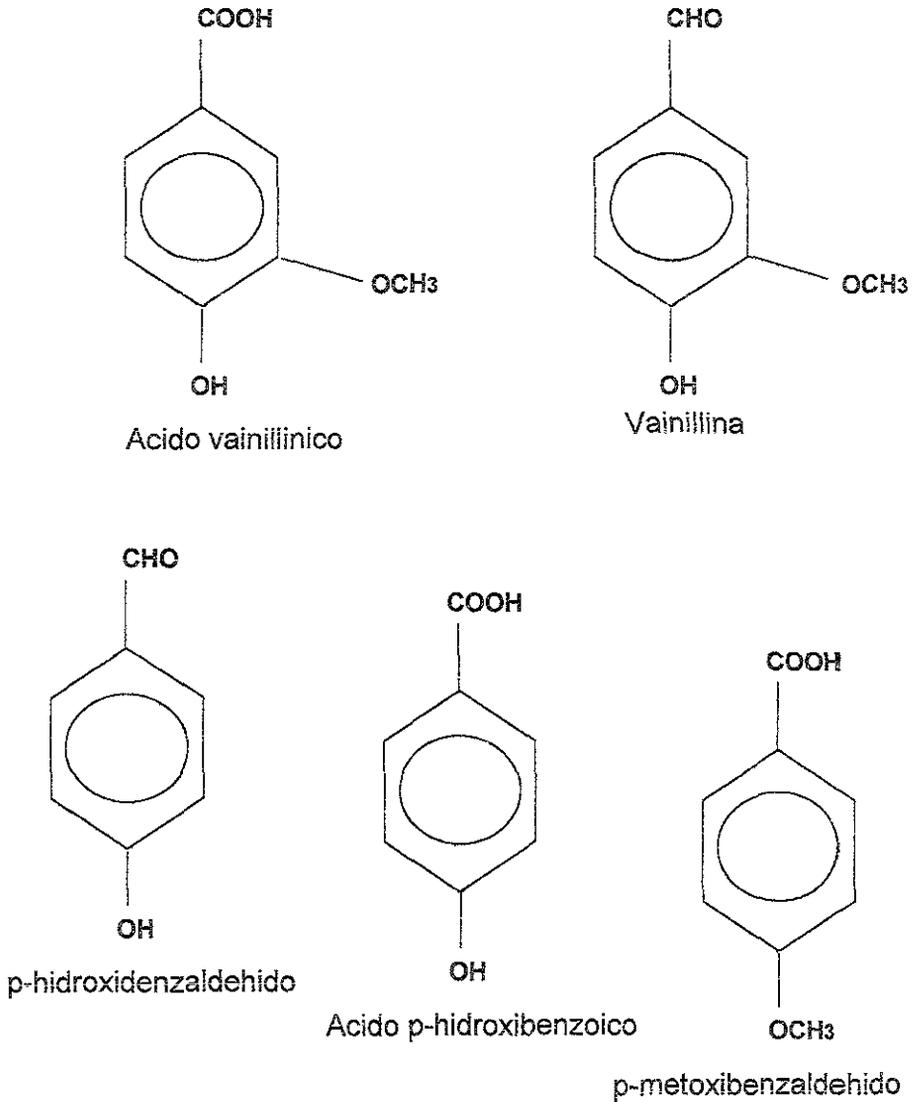


Figura 4. Principales compuestos aromáticos responsables de las características organolépticas de la vainilla.

Se ha observado una correlación entre la vainillina y el p-hidroxibenzaldehído en vainas de Madagascar (Jurgens 1981), presentándose en una proporción de 1:0.08 en los extractos naturales de estas vainas.

Ranadive 1992 realizó un estudio comparativo de los principales compuestos presentes en vainas beneficiadas utilizando vainilla de distintas regiones geográficas, encontrando los siguientes resultados:

Tabla II. Compuestos de vainilla beneficiada de diferentes regiones geográficas. (g/100g vaina) Ranadive (1992)

Origen de la vainilla	Acido p-hidroxibenzoico	p-hidroxi-benzaldehído	Acido vainillinico	Vainillina
Madagascar	0.056	0.137	0.150	1.64
Indonesia	0.034	0.093	0.077	1.17
México	0.040	0.070	0.130	0.90
Costa Rica	0.052	0.14	0.120	1.35
Jamaica	-	0.084	0.042	2.16
Tonga	0.024	0.100	0.076	1.97
Tahití	0.328	0.130	0.044	1.03

Así mismo, el autor observó que la concentración de estos compuestos, que como ya se mencionó se encuentran en forma de glucósidos en la vaina verde, se incrementa al adicionarle β -glucosidasa, en comparación a las vainas que han sido beneficiadas en la forma tradicional. Este efecto se puede deber a una concentración insuficiente de las enzimas presentes en las vainas verdes, o a un deficiente proceso que limite la acción de las enzimas

sobre el sustrato o a una inhibición de las enzimas presentes debido a la oxidación de fenoles durante el beneficio.

La fracción lipídica de las vainas probablemente también contribuye al aroma de la vainilla. Se sabe que el porcentaje de lípidos en *V.madagascariensis* es del 14% y en vainas de Tahití es del 9.3% (Ramaroson B et al 1997). Holman y Nichols (1972) reportan la presencia de alcanos, alquenos, diterpenos y triterpenos en esta fracción.

Se han identificado a los aminoácidos presentes en las vainas, entre los cuales podemos encontrar a la alanina, valina, glicina, isoleucina, prolina, treonina, serina, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina, lisina, histidina y arginina en extractos de Java, Comores, Tahití, Madagascar y México (Martin G. et al 1977), sin embargo no se sabe si desempeñan alguna función durante el beneficio.

Productos comerciales derivados de la vainilla.

Los siguientes productos se pueden elaborar a partir de vainilla beneficiada:

- Extracto natural de vainilla. El extracto de vainilla es definido por la FDA (Food and Drug Administration), "como una solución que no contiene menos del 35% de alcohol," de los principales olores y sabores extraídos de una o más unidades concentradoras de vainilla (UCV). Una unidad de vainilla es el extracto obtenido a partir de 100g de vaina de vainilla beneficiada en un litro de solvente, equivalente a por lo menos 0.11g de vainillina en 100ml de extracto. Según el número de UCV que contenga el extracto se denomina doble, (2X), triple (3X), etc. Recibiendo el nombre de extracto natural concentrado de vainilla.

Es un líquido color ámbar de olor y sabor característicos, derivado de las vainas de vainilla beneficiada, alcohol y agua el cual puede o no contener glicerina, propilenglicol, azúcar (incluyendo azúcar invertido), dextrosa, jarabe de maíz (incluye jarabe de maíz deshidratado). La concentración de alcohol etílico no debe de ser menor del 35% v/v y tener una unidad de concentración de vainilla.

El extracto de vainilla contiene alcohol-agua y materia soluble del fruto de la vainilla así como ácidos orgánicos, azúcar, proteínas, aminoácidos, resinas, fenoles y taninos. La composición de las sustancias anteriores puede cambiar dependiendo de las

condiciones de tiempo/temperatura de la extracción, del equipo, así como de la calidad de la vainilla.

- Saborizante natural de vainilla. Es el líquido color ámbar hecho con vainas de vainilla que contiene menos del 35% v/v de alcohol etílico y una concentración menor de 0.11g de vainillina en 100ml de extracto.
- Saborizante mixto de vainilla. Es una mezcla de un extracto natural de vainilla con una UCV (10g de vaina de vainilla beneficiada en 100ml de solvente) con 7.5g de vainillina U.S.P. para elaborar un extracto vainilla / vainillina U.S.P. 2x
- Oleorresina. Corresponde a los extractos de vainilla concentrados que se obtienen por la eliminación completa o parcial del solvente.
Existen varios procesos de elaboración de olerresinas, por ejemplo realizando una extracción con acetona o alcohol se destila el solvente obteniendo una sustancia oleosa, se pierden algunos compuestos aromáticos durante la destilación, principalmente se utiliza como saborizante.
- Vainilla absoluta. Es una forma concentrada del aroma a vainilla, el cual es extraído con fluidos súper críticos.

- Vainilla azucarada. Al azúcar refinada se le agrega una vaina. Se deja macerar al menos una semana para que el azúcar adquiera la fragancia, la vaina puede ser utilizada varias veces.

Métodos para la determinación de la calidad de los extractos de vainilla.

Adulteraciones.

La adulteración de los alimentos siempre ha existido, sin embargo actualmente se puede identificar con mayor facilidad un producto alterado gracias a los avances científicos en materia de análisis. En algunos casos la adulteración se debe al alto costo de los productos naturales, por lo que son substituidos por productos artificiales idénticos al natural u otros ingredientes de menor precio. En el caso del extracto de vainilla es común agregarle vainillina sintética, etilvainillina o cumarina, esta última se considera tóxica y esta prohibido su uso en alimentos.

La adulteración de extractos es una práctica común, el fruto también se puede adulterar adicionándole ácido benzoico, para simular los cristales blancos de vainillina que aparecen en la superficie de la vainilla beneficiada, o a las vainas después de realizar el extracto se les adiciona bálsamo de Perú para que emitan aroma.

La vainillina sintética es producida a partir de lignina, la cual se encuentra presente en las aguas residuales de la producción de papel.

Numerosos métodos han sido desarrollados para verificar la autenticidad de los extractos de vainilla, por ejemplo:

- Cromatografía de gases. Hoffman y Salb, (1979) utilizaron esta técnica para diferenciar en un extracto la vainillina procedente de la planta de la producida a partir de lignina, guayacol y eugenol.
- Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en papel.
- Cromatografía de líquidos.
- Determinación de la estabilidad del radio isótopo de la vainillina por espectrofotometría de masas. La vainillina natural es enriquecida con deuterio (Bricout et al 1974) y el carbono-13 (Winkler y Schmith 1980, Culp y Noakes 1992) lo comparan con el de vainillina sintética. Se identifica el sitio específico donde se encuentra el radio isótopo de la vainillina natural. Krueger y Krueger 1983,1985, también por medio de este método detectaron si un extracto se encuentra adulterado con vainillina sintética.

Algunas de las técnicas desarrolladas tienen la desventaja de ser muy caras para realizarse como análisis rutinarios o requieren mucho tiempo. Sin embargo por medio de ellas se han identificado los perfiles de algunos compuestos en los extractos naturales (Kaunzinger et al 1997).

La AOAC ha implementado varias técnicas basadas en cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), ampliamente usadas como herramienta para diversos análisis de alimentos. En el caso de la vainilla, tiene gran utilidad para la identificación de extractos adulterados, por lo que es la técnica a emplear si se desea tener un mayor control de calidad (Kenney 1990), ya que nos permite conocer la concentración de vainillina de un extracto, así como la proporción en la que se encuentran compuestos como el p-hidroxibenzaldehído, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vainillínico entre otros respecto a la vainillina.

De los estudios realizados varios tienen semejanzas en las condiciones utilizadas, algunos ejemplos son los siguientes:

Voisine (1995), utilizó las siguientes condiciones de análisis para cuantificar vainillina por medio de HPLC.

Columna C-18 fase reversa 10 μ m, 25 x 0.46cm, agua acidificada con ácido acético 1.25%(v/v) y metanol como eluyentes, un gradiente de metanol y agua con un flujo de 1ml/min y un detector de arreglo de diodos.

Brunerie (1998) utilizó una columna HP ODS Hypersil, semejante a una C-18, con buffer de citratos pH 4.66 y acetonitrilo como eluyentes con un flujo de 0.3ml/min, un gradiente de concentraciones y un detector UV a una longitud de onda de 300nm.

Lamprecht et al (1994), utilizaron como eluyentes agua/ HCl (pH de 2.7) metanol 7:3 (v/v), flujo 3.0ml/min. Columna 25 x 1 cm octedecilsilica 4 μ m de tamaño de partícula, detector de arreglo de diodos. Con estas condiciones analizaron los compuestos presentes en un extracto de vainilla natural elaborado por ellos mismos, y un extracto de vainilla sintética, tales como ácido vainillínico, 4-hidroxibenzaldehído, el ácido 4-hidroxibenzoico y vainillil alcohol, los cuales fueron relacionados con la concentración de vainillina obtenida en cada uno de los casos. En ninguno de los extractos se encontró la presencia de etilvainillina. Los análisis realizados por HPLC fueron complementados con la determinación del radio isótopo de la vainillina (SIRA) por espectrofotometría de masas.

Lamprecht et al encontraron que en extractos naturales se observan compuestos que eluyen antes de la vainillina, los cuales están ausentes en productos alterados, y en los adulterados se observan compuestos que no están presentes en extractos naturales y que en ocasiones no pueden ser identificados. Finalmente en este trabajo se concluye que un extracto adulterado puede ser identificado por medio de SIRA de una manera más precisa.

Cuando un extracto natural de vainilla es adulterado con vainillina USP, es decir la adición de este compuesto no se reporta en los ingredientes, es difícil cuantificar la vainillina USP agregada ya que la estructura química de la vainillina natural y la sintética es la misma. Sin embargo un extracto natural tiene mayor número de compuestos, y

se han estudiado sus proporciones para poder determinar la autenticidad.

De acuerdo a las recomendaciones de International Organization of the Flavor Industry (IOFI), la autenticidad de un extracto puede ser juzgada por presentar las siguientes proporciones:

- Vainillina/p-hidroxibenzaldehido 1/2
- Vainillina/ácido p-hidroxibenzoico 5.3/11
- Vainillina/ácido vainillinico 1.5/2.9
- Acido p-hidroxibenzoico/p-hidroxibenzaldehido 0.15/0.35
- Ácido vainillinico/p-hidroxibenzaldehido 0.53/1.00

Comercialización de la vainilla.

En el mundo

Estados Unidos de Norteamérica es el mayor consumidor de vainilla en el mundo, ya que compra cerca del 67% de la producción mundial, que equivale a unas 1 400 toneladas, mientras que Europa tiene una demanda de 450 toneladas, siguiendo en tercer lugar Japón con 70 toneladas anuales.

En E.U.A. el mayor porcentaje del saborizante esta destinado a la elaboración de helados, la vainilla provenía principalmente de Indonesia y era adquirida no por su calidad sino por el bajo costo del producto ya que anteriormente se encontraba libre de impuestos. Cuando se permitió la exportación de la vainilla de Madagascar, se vieron afectados los precios del fruto en el ámbito mundial ya que bajaron de 74 dólares/Kg a 24-35 dólares/Kg por lo tanto Indonesia no pudo competir con la vainilla de Madagascar ya que esta tiene un menor precio y una mayor calidad.

Otros países productores de vainilla han presentado dificultades en el mercado ante esta situación, como es el caso de Comoros, Tonga y México ya que también tienen que competir con Madagascar lo cual les ha restado posición en el mercado norteamericano (Henry T et al 1998).

En México.

La industria de la vainilla en México tuvo un auge importante entre 1955 y 1959, sin embargo en la década de los sesenta presentó una caída drástica. La producción en el país no se ha recuperado de dicha situación y hoy en día apenas representa el 0.5% del mercado mundial. Una de las posibles causas de esta disminución pudo haber sido la baja de los precios de la vainilla en el mercado internacional debido a la presencia de saborizantes artificiales, los cuales obviamente tienen un precio inferior al del extracto natural. Simultáneamente productores como Madagascar, Uganda, Indonesia, saturaron el mercado internacional. Existe una gran competencia con la vainilla de Madagascar ya que tiene una alta calidad, y representa una gran porción de la vainilla importada. La vainilla de Java ha incrementado su importancia y calidad. Comoro es el siguiente país que tiene una producción significativa en el ámbito mundial, ya que representa el 12% del total de importaciones de E.U.A., siendo la calidad de sus extractos comparable con la de Madagascar.

Otra causa fueron los factores climáticos como heladas que afectaron la producción, en México durante 1960 y 1962 disminuyéndola en un 70%. Los productores no pudieron recuperar las pérdidas sufridas en los años siguientes. En la década de los ochenta se intentó rescatar la producción, pero para entonces ya se había perdido tecnología y experiencia en el manejo de las plantaciones.

El 85% de la producción nacional se desarrolla en Veracruz, el área vainillera se localiza en el lado norte abarcando Papantla, Tecolutla, Gutiérrez Zamora, Cazones, Coatzintla, Coxquihui, Misantla, Martínez de la Torre y Zozocolco. Puebla participa con el 5% e Hidalgo, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Quintana Roo con el restante 10% de la producción. Sin embargo los vainilleros han tenido problemas en la comercialización de su producto debido a la falta de apoyo por parte de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, por lo que en estos momentos la vainilla esta a punto de desaparecer del activo agrícola en México al reducirse en un 65% la superficie cosechada provocando un descenso en la producción.

En total se dispone de 1056 unidades de producción agrícola para el cultivo de la vainilla, las cuales equivalen a 1270.411 hectáreas, en desarrollo existen 632.215 y 631.19 en producción, en las cuales se obtienen 65,219 Kg./año (Cultivos Perennes de México 1991). Según las estadísticas del Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática (INEGI) correspondientes al ciclo 95/96 la vainilla es irrelevante en la economía agrícola de la región.



Figura 5. Mapa de la República Mexicana, señalando los principales estados productores de vainilla.

El problema principal que enfrenta la producción de vainilla es la comercialización. La vainilla producida naturalmente a partir de la plantación y cuidados de la *Vanilla planifolia*, requiere de una gran cantidad de mano de obra, acarreo y almacenamiento; lo que eleva su costo de producción y por lo tanto su precio de venta.

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se describe la extracción enzimática del precursor de la vainilla a partir de vainas

maduras sin beneficiar para su posterior transformación enzimática, se propone una extracción enzimática-alcohólica por medio de la cual la glucovainillina se liberó del tejido vegetal para hidrolizarla mediante la adición de una β -glucosidasa comercial y finalmente se agregó etanol. Se decidió analizar la posibilidad de modernizar el beneficio, mediante el proceso mencionado resultando una alternativa interesante para la extracción eficiente, productiva y que permite reducir los tiempos del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de vainas

Las vainas de vainilla se colectaron en tres lotes diferentes:

1. El primer lote de vainas verdes de vainilla, se cortó el 10 de Diciembre de 1997 en el ejido 1° de Mayo, en la región de Papantla, Veracruz en el correspondiente ciclo 1996 – 1997.
2. El segundo lote de vainas verdes de vainilla fue recolectado en el periodo 1997-1998 en la propiedad del Sr. Vallejo de la misma región.
3. En el tercer lote se trabajó con vainas beneficiadas pertenecientes a la propiedad del Sr. Vallejo en la región de Papantla, Veracruz correspondientes al ciclo 1996-1997.

Las muestras se almacenaron en refrigeración a una temperatura entre 4 y 6°C, y posteriormente fueron cortadas en trozos de 0.5cm aproximadamente antes de la extracción.

Determinación de humedad.

La humedad se determinó por deshidratación por liofilización, en este método se extrae el agua de los tejidos por sublimación mientras estos están congelados y en un ambiente de vacío.

Se pesó 1g de vaina, por duplicado, en un recipiente de vidrio de 50ml y se congeló durante 2hrs a -70°C en un ultracongelador (Puffer Hubbard). Las muestras se liofilizaron (Liofilizadora Labconco) en vasos de 250ml (Labconco) durante 20hrs a una temperatura de -30°C y una presión de 0.381 mBar

El porcentaje de humedad se determinó por diferencia de pesos después del secado.

Determinación de la longitud de onda de absorción de vainillina y etilvainillina.

Con el objetivo de identificar la longitud de onda de los compuestos, se prepararon soluciones por separado de 0.12 mg/ml de vainillina, de etilvainillina y p-hidroxibenzaldehído (Sigma). Se disolvieron en una fase de acetonitrilo/buffer de fosfatos y citratos pH de 4.6 (70:30) (Acetonitrilo Mallinckrodt CROMAR HPLC, el buffer de fosfatos y citratos se elabora con ácido cítrico 0.1M Baker y fosfato dibásico de sodio 0.2M Baker) Las soluciones se colocaron en celdas de cuarzo y se determinó la longitud de onda a la cual cada uno de ellos absorbe mediante un espectrofotómetro UV/Vis Beckman, DU-65, a una velocidad de 750nm/min.

Curva patrón.

La ecuación de la curva patrón se obtuvo inyectando por triplicado cada uno de los estándares en el HPLC, los cuales se encontraban a diferentes concentraciones. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones para los estándares de vainillina y etilvainillina. (Los datos y la curva se reportan las tablas XIII y XIV del anexo I.) donde "y" es la absorbancia y "x" es la concentración del estándar en mg/ml

VAINILLINA.

$$Y = 9.248(X) + 1448.429$$

$$r = 0.9918$$

ETILVAINILLINA.

$$Y = 11.1906(x) + 1188.4770$$

$$r = 0.9894$$

**Separación de los compuestos presentes en vainas de vainilla sin beneficiar por medio de cromatografía de líquidos de alta presión.
(HPLC)**

Condiciones finales.

Las condiciones establecidas fueron utilizando:

Cromatógrafo de líquidos de alta presión

Beckman System Gold

Detector programable Module 126

Detector programable Module 166 Detector Uv / Vis.

Columna Beckman C18 4.66mm x 25cm

Inyección. 20µL

Fase móvil: Metanol: Agua pH de 4.0 (el agua se acidifica con Ácido acético glacial Mallinckrodt AR grado analítico y se filtra con un filtro Millipore de 0.45 μ m)

Tabla III. Condiciones cromatográficas establecidas.

Tiempo inicial (min.)	Flujo (ml/ min.)	Duración (min.)	% Agua	% Metanol	Duración (minutos)
1.10	0.8	-	60	40	-
7.00	1.0	0.5	65	35	9.0
12.10	0.8	4.0	60	40	4.0

Detector UV / Vis $\lambda = 278$ nm Tiempo de análisis 16 min.

Determinación de la actividad β -Glucosidasa en un extracto de vainas verdes.

La actividad de β -glucosidasa del complejo celulolítico usado (marca Celluclast) se cuantificó usando un extracto obtenido por el método soxhlet (el cual se describe posteriormente). Se tomó una alícuota a la cual se le agregó aproximadamente 1mg de Celluclast, se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente y se comparó con otra alícuota que no contenía la enzima empleada.

Esto se realizó con el objetivo de hacer cualitativa la presencia o ausencia la actividad de la β -glucosidasa, así como la determinación cualitativa de la identificación de la glucovainillina y vainillina. Este experimento fue necesario realizarlo en un extracto del fruto sin beneficiar ya que nos daría una idea de cómo se comportarían las enzimas en dicho sistema.

Ambas alícuotas se filtraron en una membrana de $0.45\mu\text{m}$ (Millipore), antes de ser inyectadas en el HPLC.

Extracción de vainillina y glucovainillina.

Extracción alcohólica por el método soxhlet.

- **Soxhlet.** Se pesaron dos gramos de vainilla, previamente homogeneizada, los cuales estaban cortados en trozos de 0.5cm aproximadamente. En un aparato Soxhlet se colocó la muestra con 100ml de etanol (Etanol absoluto Mallinckrodt) al 47.5% durante 8 horas a una temperatura de 70°C aproximadamente. Se añadió etilvainillina como estándar interno (5ml de una solución de $0.12\text{g}/100\text{ml}$). El etanol se evaporó en el mismo sistema y el extracto se transfirió a un matraz volumétrico de 100ml y se aforó con agua grado HPLC. El extracto se filtró en una membrana de $0.45\mu\text{m}$ (Millipore), antes de ser inyectado en el cromatógrafo de líquidos.

Pretratamientos enzimáticos.

Inicialmente se realizaron reacciones enzimáticas únicamente con 2g de vaina, debido a las dificultades que presenta trabajar con tamaños de muestra pequeños en un producto natural, se aumentó la cantidad de materia prima a 50g y se realizó una extracción final con etanol, ya que la solubilidad de los compuestos es un factor importante en la elaboración de un extracto. Se agregó etilvainillina como estándar interno.

Las enzimas usadas para las reacciones enzimáticas con 2g de muestra fueron las siguientes:

- **Viscozyme L.** (Novo) Es una mezcla de carbohidrasas (arabanasa, celulasa, beta-pululanasa, hemicelulasa y xilanasa) y tiene actividad frente a pectina, estas enzimas se producen a partir de una cepa de *Aspergillus*. Las condiciones óptimas de actividad son a una temperatura de 40 a 50°C y un pH de 3.3 a 5.5.
- **Macerace.** (Enziquim). Es una mezcla de pectinasa, celulasa, hemicelulasa, producido por la fermentación de cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*. Tiene estabilidad en un rango de pH de 3.0 a 5.5, siendo su pH óptimo 4.0 y su temperatura óptima de actividad es de 50°C.

Las reacciones con 50g de materia prima se llevaron a cabo con las siguientes enzimas:

- **Viscozyme L**
- **Celluclast.** (Novo Nordisk 3038/94). Celulasa obtenida a partir de cepas de *Trichoderma reesii*, condiciones optimas de actividad a una temperatura de 48 a 60°C, pH de 4.5 a 4.8

Posteriormente se realizaron mezclas de las dos enzimas seleccionadas y se invirtió el orden de incubación, el pretratamiento se realizó de la siguiente forma:

- **Viscozyme L con Celluclast**
- **Celluclast con Viscozyme L**

Extracción de vainillina y glucovainillina en una muestra de 2g

En las reacciones enzimáticas realizadas con 2g de muestra se llevó a cabo la siguiente metodología.

Se cortaron 100g de vainilla en trozos de 0.5 cm aproximadamente y se colocaron 2g de vaina en un vaso enchaquetado con 10ml de agua, 1% v/v de la enzima y etilvainillina como estándar interno. La extracción se llevó a cabo durante 8 horas con agitación a una temperatura de 50°C. Se filtró con papel filtro Whatman #2 y aforó a 25 ml con agua grado HPLC. El extracto se filtró en una membrana 0.45µm (Millipore) antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

Se realizó un control en el cual no se agregó enzima, solamente se incubó la vaina en las condiciones antes mencionadas, junto con la etilvainillina.

Con este tamaño de muestra solamente se realizó una extracción alcohólica con Viscozyme L. La reacción con la enzima se llevó a cabo durante 2 horas con agitación constante a una temperatura de 50°C. Posteriormente se le agregó etanol para obtener un extracto con el 50% de alcohol y se continuó con las mismas condiciones durante 8 horas. Los extractos se filtraron en papel filtro Whatman #2 y se aforó a 25ml

con agua grado HPLC. Posteriormente se filtraron en una membrana de 0.45 μ m (Millipore) antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

Extracción de vainillina y glucovainillina en una muestra de 50 g

Las reacciones que se llevaron a cabo con 50g de muestra, tuvieron el siguiente proceso:

Se cortaron 100g de vainilla en trozos de 0.5 cm aproximadamente y se colocaron 50g de vaina en un vaso enchaquetado con 150ml de agua. La extracción se llevó a cabo durante 8 horas con agitación constante a una temperatura de 50°C.

El control realizado únicamente contenía la vaina y 150 ml de agua. Se incubó en las condiciones antes mencionadas.

En el pretratamiento se agregó la enzima correspondiente en una concentración del 1% v/v.

Las reacciones por medio de la mezcla de enzimas se realizaron de la siguiente forma:

Se cortaron 100g de vainilla en trozos de 0.5 cm aproximadamente y se colocaron 50g de vaina en un vaso enchaquetado con 150ml de agua, se le agregó el 1% de una enzima v/v. La extracción se llevó a cabo durante 8 horas con agitación constante a una temperatura de 50°C. Posteriormente se agregó la otra enzima y la extracción continuó durante 8 horas más en las mismas condiciones. Se tomó una alícuota y se diluyó 1:2 con agua grado HPLC, se filtró con papel Whatman #2, se tomaron 2ml de extracto

y se aforaron a 10ml con agua grado HPLC. El extracto se filtró en una membrana 0.45 μ m (Millipore) antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

Extracciones alcohólicas posteriores al tratamiento enzimático.

En todas las reacciones enzimáticas en las cuales se utilizaron 50g de muestra una vez realizada esta, se tomó una alícuota de la fase acuosa y se le agregó etanol absoluto para obtener un extracto con 50% de alcohol; es decir se realizó una dilución 1:2 con etanol absoluto, el extracto obtenido se filtró con papel Whatman #2, posteriormente se tomaron 2ml y aforaron a 10ml con agua grado HPLC. Se filtró en una membrana de 0.45 μ m (Millipore) antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

Determinación de actividad específica de Viscozyme L y Celluclast.

Se elaboró una solución de celobiosa (Sigma) al 0.5%, se colocaron 10ml de la solución en tubos de ensayo, se agregó la enzima correspondiente en las siguientes concentraciones 0.1%, 0.15% y 0.25% v/v, es decir 10, 15 y 25 μ L respectivamente. Los tubos se incubaron a una temperatura de 50°C y se determinaron azúcares reductores por el método del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) al tiempo 0, 10 y 20 minutos.

Las enzimas utilizadas fueron:

- **Viscozyme L.**
- **Celluclast.**

Se elaboró una curva patrón de glucosa (la cual se reporta en la tabla XV del anexo II) para determinar la concentración de azúcares reductores, y se obtuvo la siguiente ecuación donde "y" es la absorbancia y "x" la concentración de glucosa en mg/ml.

$$Y = -0.1959 (x) + 1.08739$$

$$r = 0.9964$$

Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS)

Para la determinación de la actividad enzimática se realizó la cuantificación de azúcares reductores de acuerdo al método de DNS.

En un tubo de ensayo se coloca 1ml de muestra, 1ml de DNS, (Hidróxido de sodio al 1% JT Baker ACS 37722-01, Fenol 0.2% Mallinckrodt reactivo analítico 0028, 1% Acido 3,5 Dinitrosalicílico. Sigma D-0550, Sulfito de sodio dibásico anhidro 0.05% Baker 3828-01), se tapan con canicas y se colocan en un baño maría de agua hirviendo durante 5 minutos. Al termino se colocan en un baño de agua fría, se agregan 10ml de agua destilada y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro Uv/Vis Beckman, DU-65 Spectrophotometer, a 540nm contra un blanco de agua y reactivo (Lorenz Miller Gail 1959)

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Almacenamiento.

Durante el mes y medio que se mantuvieron almacenadas las vainas en refrigeración a una temperatura entre 4 y 6°C se observaron cambios físicos: el color inicial era verde y se transformó en café, lo que indica que probablemente ocurrieron reacciones de oscurecimiento enzimático, mediadas por enzimas oxidativas, como la peroxidasa y la polifenoloxidasas (Wild-Altamirano 1969). Arana (1943) enfatizó sobre la importancia que desempeña la peroxidasa en este sistema en particular y en conjunto con las enzimas oxidativas en general. La peroxidasa es resistente al calor, tiene la capacidad de regenerarse y sobrevivir el horneado o el escaldado, así como tratamientos de acondicionamiento.

Determinación de humedad.

La humedad de la vaina verde para el lote 1 fue aproximadamente del 88.7%, para el lote 2 fue de 86.8% y el lote 3 de 25.8%. Este valor sirvió para calcular la concentración de vainillina en base seca y así poder comparar objetivamente las extracciones realizadas por los diferentes métodos. La única referencia que se tiene del contenido de humedad en vainas verdes es la reportada por Ranavide 1994, el cual maneja un rango entre el 82 y 85% cuando el fruto va a ser cortado. Sin embargo no se describe el método utilizado.

La vaina beneficiada debe de tener una humedad del 25% para la elaboración de un extracto 1 fold.

Determinación de la longitud de onda de absorción de vainillina y etilvainillina.

Antes de iniciar la cuantificación de los principales compuestos presentes en la vaina como son la vainillina y el p-hidroxibenzaldehído, así como el estándar interno de etilvainillina, se determinó la longitud de onda a la cual absorbían cada uno de ellos y se escogió un valor en común.

Este experimento es importante ya que en la literatura se reportan diferentes valores para la cuantificación de estos compuestos, por ejemplo Archer W. 1989 trabaja a 275nm, Guarino y Brown 1985 a 254 y 280nm, Brunerie 1998 a 300nm y en otros casos utilizan un arreglo de diodos. De esta forma se estableció que se trabajaría a 278nm.

A continuación se pueden observar los espectros de absorción de los compuestos en las figuras 6,7 y 8.

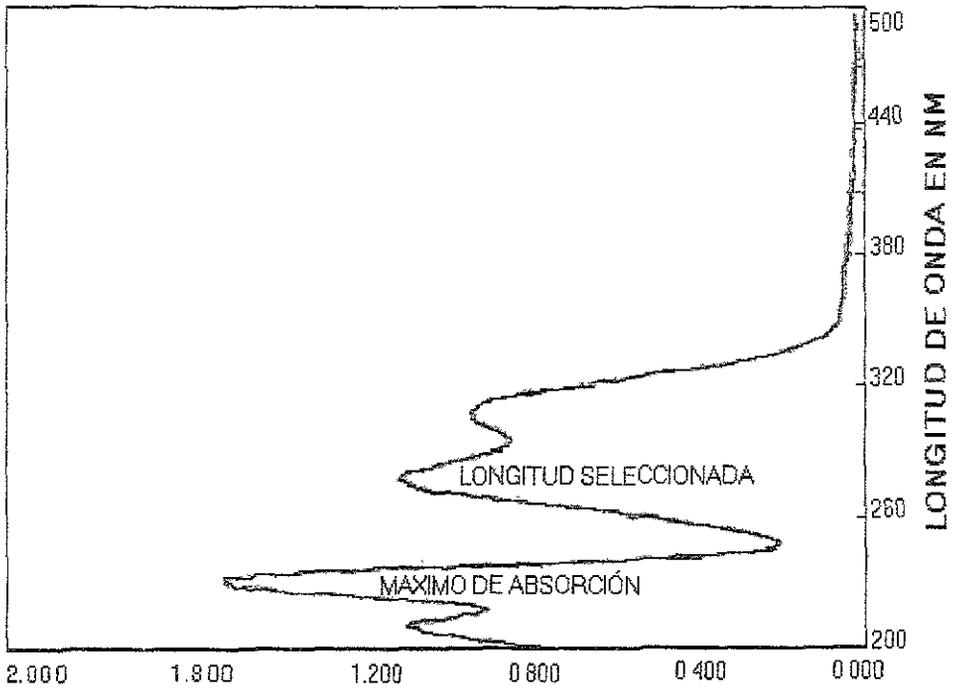


Figura 6. Espectro de absorción de etilvainillina 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.076 a una longitud de onda aproximadamente de 250nm.

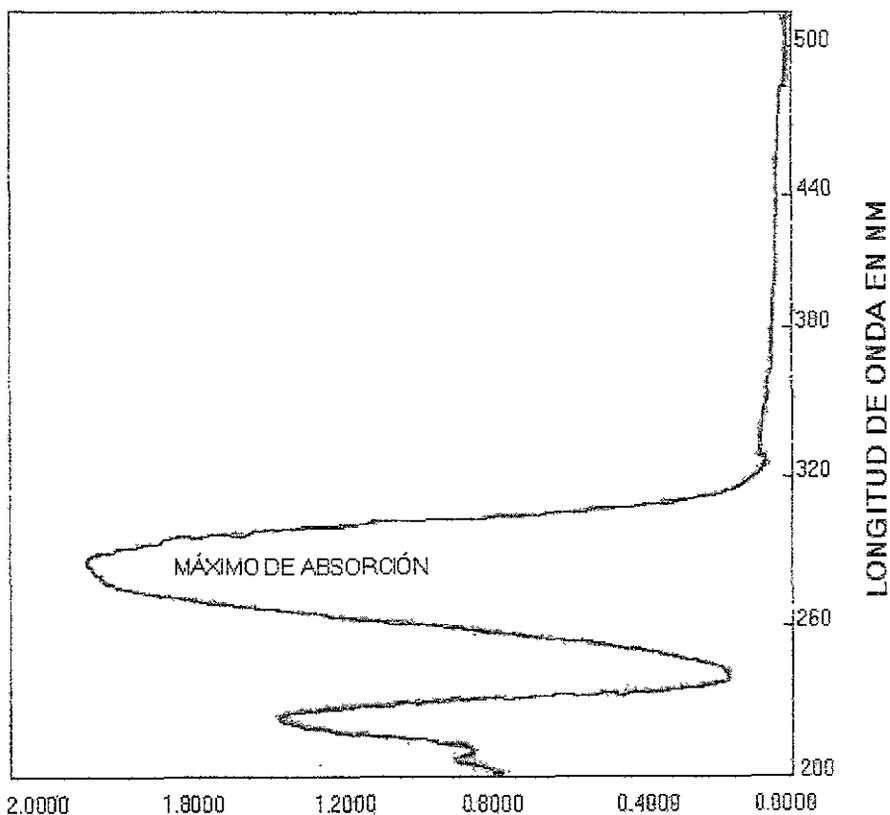


Figura 7. Espectro de absorción de p-hidroxibenzaldehído 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.798 a una longitud de onda aproximadamente de 280nm.

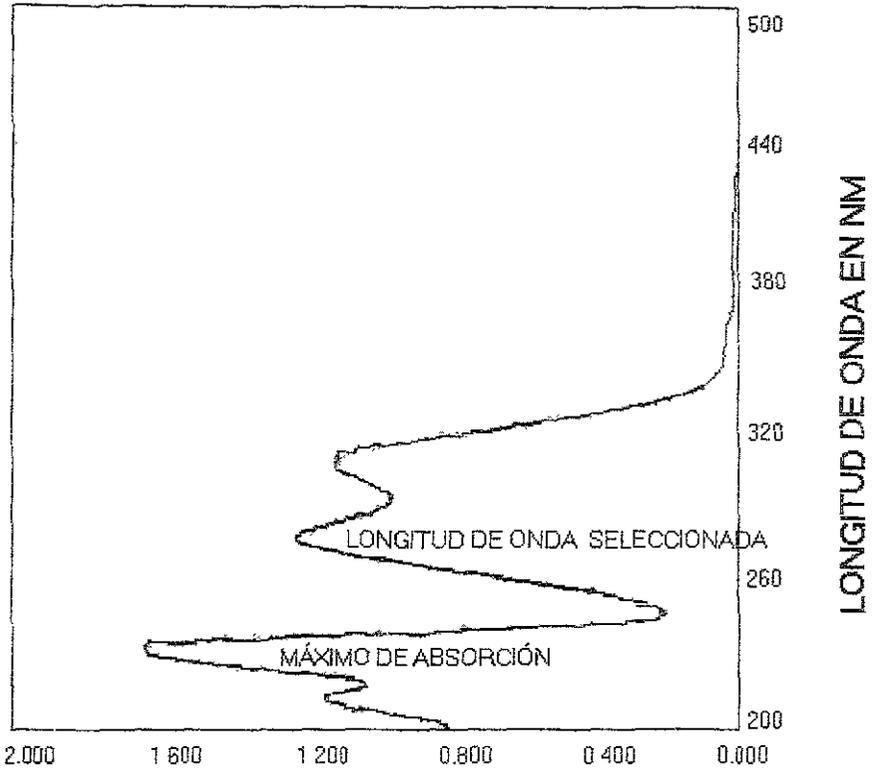


Figura 8. Espectro de absorción de vainillina 0.012mg/ml, a una longitud de onda entre 200 y 500nm, fase acetonitrilo: buffer de fosfatos 70:30, velocidad de 750nm/min, máximo de absorción 1.223 a una longitud de onda aproximadamente de 225nm.

Separación de los compuestos presentes en vainas de vainilla sin beneficiar por medio de Cromatografía de líquidos de alta presión. (HPLC)

Determinación de la fase móvil.

Para establecer el método de cuantificación de vainillina por HPLC, se tuvo que optimizar la técnica de análisis, tomando como referencia a varios autores.

Brunerie (1998) propone el uso de un buffer de citratos/fosfatos pH de 4.66 y acetonitrilo con un gradiente de los dos solventes a un flujo constante. Sin embargo se presentaron dificultades al trabajar con el buffer de citratos/fosfatos debido a la gran cantidad de sales. La separación de los compuestos no fue adecuada por lo que se modificaron los solventes, utilizando agua con un pH de 4.0 (acidificada con ácido acético glacial Mallinckrodt AR grado analítico) y filtrada en una membrana de 0.45 μ m (Millipore). Se empleo como solvente de 80% agua (pH de 4.0) y 20% acetonitrilo.

Posteriormente se sustituyó el acetonitrilo por un compuesto de polaridad similar como el metanol ya que su polaridad es menor a la del agua y tiene una baja viscosidad. Se consideró el método propuesto por Lamprecht (1994) en el cual utiliza 70% de agua acidificada con ácido clorhídrico pH de 2.8 y 30% de metanol, con un flujo isocrático y utilizando un detector con un arreglo de diodos.

Con las nuevas condiciones, metanol y agua acidificada a un valor de pH de 4.0, se probaron varios gradientes. Debido a que la estructura

de la vainillina y el p-hidroxibenzaldehído son semejantes al igual que sus polaridades, tienen un orden de elución muy cercano lo que ocasionó dificultades en la separación de los mismos. Se realizó un gradiente en el cual se varió el flujo y la concentración de los solventes, con estas modificaciones el tiempo de elución cambió y se pudo observar la separación de los compuestos en el cromatograma.

Selección de la columna.

Brunerie (1998) propone el uso de una columna, Hewlett Packard ODS Hypersil, de acuerdo a estas características se escogió una columna equivalente, pero con un tamaño de partícula menor, para tener una mejor resolución. La columna que se utilizó fue Beckman C18 (4.66mm x 25cm. 5µm).

Condiciones cromatográficas establecidas:

- Columna Beckman C18 4.66mm x 25cm.
- Inyección. 20µL
- Fase móvil: Metanol: Agua pH de 4.0 (el agua se acidifica con ácido acético).

Tabla IV. Condiciones cromatográficas establecidas.

Tiempo inicial (min.)	Flujo (ml/ min.)	Duración (min.)	% Agua	% Metanol	Duración (minutos)
1.10	0.8	-	60	40	
7.00	1.0	0.5	65	35	9.0
12.10	0.8	4.0	60	40	4.0

Detector UV / Vis $\lambda = 278$ nm Tiempo de análisis 16 min.

A continuación se presentan algunos cromatogramas elaborados con el método establecido. Figuras 9,10 y 11.

de la vainillina y el p-hidroxibenzaldehído son semejantes al igual que sus polaridades, tienen un orden de elución muy cercano lo que ocasionó dificultades en la separación de los mismos. Se realizó un gradiente en el cual se varió el flujo y la concentración de los solventes, con estas modificaciones el tiempo de elución cambió y se pudo observar la separación de los compuestos en el cromatograma.

Selección de la columna.

Brunerie (1998) propone el uso de una columna, Hewelett Packard ODS Hypersil, de acuerdo a estas características se escogió una columna equivalente, pero con un tamaño de partícula menor, para tener una mejor resolución. La columna que se utilizó fue Beckman C18 (4.66mm x 25cm. 5µm).

Condiciones cromatográficas establecidas:

- Columna Beckman C18 4.66mm x 25cm.
- Inyección. 20µL
- Fase móvil: Metanol: Agua pH de 4.0 (el agua se acidifica con ácido acético).

Tabla IV. Condiciones cromatográficas establecidas.

Tiempo inicial (min.)	Flujo (ml/ min.)	Duración (min.)	% Agua	% Metanol	Duración (minutos)
1.10	0.8	-	60	40	
7.00	1.0	0.5	65	35	9.0
12.10	0.8	4.0	60	40	4.0

Detector UV / Vis λ= 278 nm Tiempo de análisis 16 min.

A continuación se presentan algunos cromatogramas elaborados con el método establecido. Figuras 9,10 y 11.

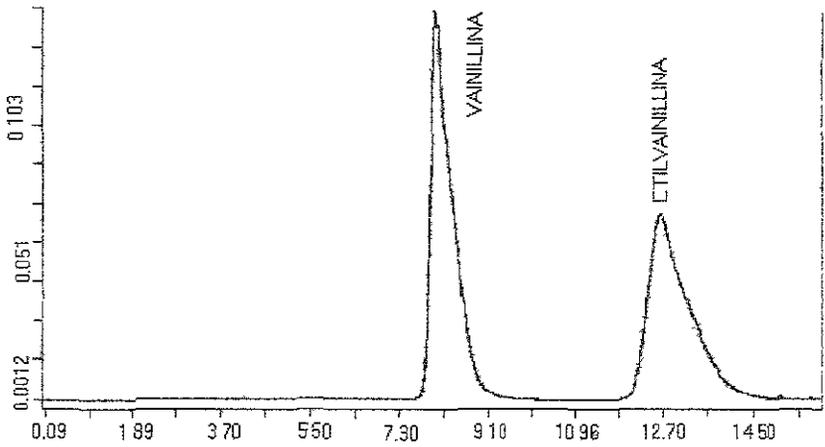


Figura 9. Cromatograma los estándares de vainillina (0.06mg/ml) y de etilvainillina 0.6mg/ml elaborado con las condiciones establecidas para la creación de la curva patrón correspondiente.

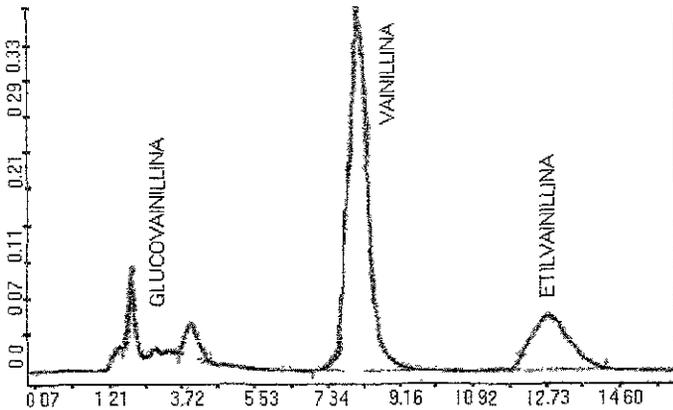


Figura 10. Cromatograma de un extracto de vainas sin beneficiar elaborado por el método soxhlet.

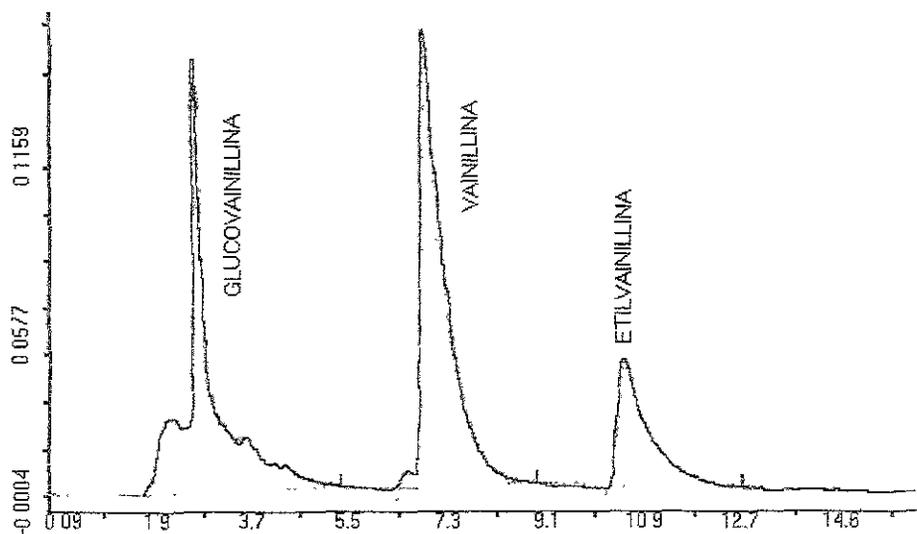


Figura 11. Cromatograma de un extracto de vainas sin beneficiar elaborado por el complejo enzimático Viscozyme L, usando como solvente agua.

Determinación de la actividad de β -Glucosidasa en un extracto de vainas verdes.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se observó el perfil de un extracto de vainas verdes de vainilla obtenido a partir del método soxhlet, el cual se mantuvo en reflujo durante 24 horas, utilizando como solvente etanol al 47.5% y adicionando etilvainillina como estándar interno. Se eligió este estándar por que no se encuentra de forma natural en la vainilla, eluye cerca del compuesto a evaluar y no reacciona con otros componentes de la muestra. Por otra parte ayuda a cuantificar de forma indirecta la concentración aproximada de glucovainillina presente.

(Figura 12) En el extracto se identificaron compuestos tales como la vainillina y la etilvainillina. La glucovainillina se reconoció en el cromatograma gracias a referencias en la literatura (Brunerie 1998), puesto que no se contaba con el estándar.

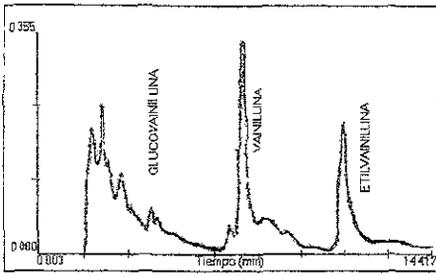
Posteriormente a una alícuota del mismo extracto se le agregó un miligramo aproximadamente de Celluclast, se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Se filtró y se inyectó en el HPLC para observar si había algún cambio en el perfil del extracto antes y después de adicionar la enzima. Ambas muestras se encontraban a la misma concentración, por lo que las pruebas realizadas fueron únicamente cualitativas, ya que solamente se quería observar si la enzima podía transformar o no a la glucovainillina presente en los extractos.

En el cromatograma (Figura 12) se observa que el pico identificado como vainillina aumentó y otro compuesto presuntamente registrado como glucovainillina disminuyó con la adición de la enzima.

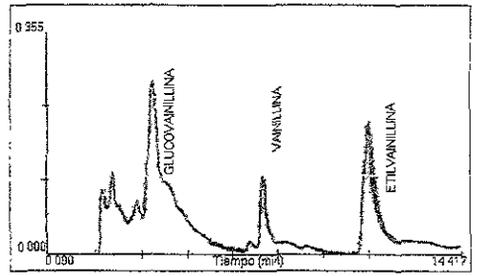
Por lo que se determinó que esta enzima (Celluclast) tenía actividad β -glucosidasa en un sustrato donde predominan los enlaces β -glucosídicos y particularmente en un sustrato de vainilla sin beneficiar.

Es importante realizar estudios más completos de la enzima para comprobar que se lleve adecuadamente la transformación, en este caso no se profundizó por tratarse de una enzima comercial, la cual no está pura, puesto que es una mezcla de enzimas con diferentes actividades que pueden favorecer el rompimiento de otras estructuras, pero en este caso el compuesto de mayor interés es la glucovainillina.

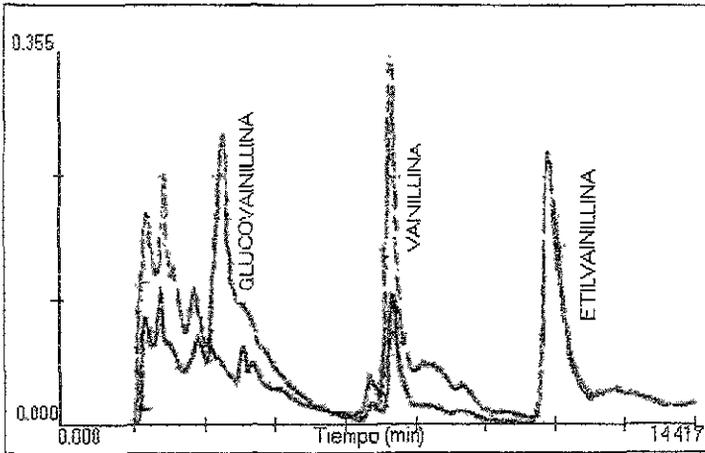
A partir de estos resultados se escogieron las enzimas para poder elaborar extractos con altas concentraciones de vainillina partiendo de vainas sin beneficiar, en las cuales, se encuentra presente la glucovainillina y otros precursores en forma de glucósidos.



B



A



C

Figura 12. Perfil de un extracto obtenido por el método soxhlet a partir de vainas sin beneficiar. Una alícuota del mismo extracto es tratado con aproximadamente 1mg de Celluclast (complejo enzimático), e incubado 2 horas a temperatura ambiente.

- A. Extracto de vainas sin beneficiar obtenido por el método soxhlet.
- B. Extracto de vainas sin beneficiar obtenido por el método soxhlet y tratado con Celluclast.
- C. Cromatogramas A y B sobrepuestos en los que se puede observar la actividad β -glucosidasa de Celluclast mediante la hidrólisis de la glucovainilina y la formación de vainilina.

Determinación de la actividad específica.

Para determinar la actividad específica tanto del viscozyme como del celluclast se utilizó como sustrato una solución de celobiosa 0.5%. La celobiosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, las unidades de D-glucosa están unidas por un enlace β , por lo tanto la celobiosa es un 4-O (β -D glucopiranosil)-D-glucopiranososa. Solamente puede ser hidrolizada por enzimas β -glucosidasa que rompan este tipo de enlaces. La enzima va a romper las uniones cristalinas de la celobiosa y actúa en el paso de hidrólisis para producir azúcares reductores. Por lo tanto estos azúcares se pueden cuantificar por medio de una reacción colorimétrica como DNS. Se utiliza como sustrato este disacárido debido al tipo de enlace que presenta, puesto que la glucovainillina tiene un enlace similar, este experimento podría dar un parámetro del comportamiento de estos complejos enzimáticos en la vainilla. Las velocidades de reacción no son concluyentes ya que se está trabajando con una mezcla de enzimas.

En las gráficas 5 y 6 del anexo III se observa el comportamiento de las enzimas, la pendiente nos indica los miligramos de glucosa producidos por mililitro (A partir de la solución de celobiosa) respecto al tiempo de incubación expresado en minutos, en las condiciones de temperatura y pH establecidas. La actividad específica va a referir este valor de acuerdo a la concentración de enzima utilizada.

Así mismo vemos que la actividad de viscozyme L utilizando como sustrato celobiosa es mayor a la de celluclast. Sin embargo en ninguno de los dos casos su actividad aumenta considerablemente al incrementar la concentración de la enzima.

Los resultados obtenidos respecto a la actividad de viscozyme L utilizando como sustrato celobiosa se reportan en la tabla V y los resultados de Celluclast se reportan en la tabla XVI del anexo III

Tabla V. Determinación de actividad específica de viscozyme L, empleando como sustrato celobiosa al 0.1%, 0.15% y 0.25% a una temperatura de 45°C y un pH de 4.0

Concentración de enzima μL	Pendiente mg glu/ml min.	Coefficiente de regresión	Actividad específica mg glucosa / μL E min.
10	0.0442	0.976	0.00442
15	0.1158	0.997	0.00772
25	0.1297	0.986	0.0052

En la gráfica V del anexo III se muestran estos resultados.

Extracción de vainillina y glucovainillina.

Las extracciones de vainillina y glucovainillina se llevaron a cabo en varias etapas, las cuales se mencionan a continuación.

Determinación del tamaño de muestra.

Inicialmente se comenzó a trabajar con 2g de muestra, pero como se trata de un producto natural pueden existir variaciones entre las muestras de un lote, por lo tanto se decidió aumentar el tamaño a 50g tomando una parte representativa del lote y al mismo tiempo verificar la reproductibilidad del método utilizado.

El principal problema al cual nos podíamos enfrentar era la diferencia en las concentraciones de vainillina y glucovainillina y con una muestra más grande se disminuyen los errores por parte de la misma.

Extracción alcohólica por el método de soxhlet.

Es importante la realización de un extracto a partir de soxhlet, puesto que funciona como control positivo del experimento.

Se verificó que este método era reproducible y que la concentración promedio de vainillina no variaba a lo largo del fruto, se confirmó mediante la elaboración de varios extractos a partir de fracciones de una misma vaina. La concentración de vainillina podría modificarse a lo largo de la vaina ya que no se tiene certeza de la ubicación del compuesto pudiendo encontrarse en las semillas o en el tejido.

Se trabajó con dos tipos de muestra, en el primer caso se realizó la extracción de una vaina, la cual fue dividida en tres fracciones, se analizó cada una de las partes por separado y se compararon. Los resultados se presentan en la tabla VI.

En el segundo caso se realizó la extracción tomando 2g de muestra a partir de 100g de vainas homogeneizadas, para así tener una muestra representativa. Estos resultados se encuentran reportados en la tabla VII.

Una vez realizados los extractos, se midió la vainillina separada en el HPLC y se reportó la concentración con base a la curva patrón que se describe en materiales y método.

Así mismo se cuantificó la concentración de glucovainillina presente en la muestra, este valor es un estimado puesto que se calculó de acuerdo al estándar interno y se trata de compuestos con estructuras diferentes.

Tabla VI. Concentración de vainillina y glucovainillina (g/100g vaina seca) obtenida a partir de la extracción por soxhlet, tomando como muestra una vaina.

Vainillina (g/100g vaina seca)	Valor estimado de Glucovainillina (g/100g vaina seca)
3.324	0.193
3.022	0.215
3.148	0.235
3.227	0.207
Promedio = 3.184	Promedio = 0.217
D.S. = 0.1106	D.S. = 0.01629
% C.V. = 3.47	% C.V. = 7.5

Tabla VII. Concentración de vainillina y glucovainillina (g/100g vaina seca) obtenida a partir de la extracción por soxhlet tomando como muestra vainas homogeneizadas.

Vainillina (g/ 100g vaina seca)	Valor estimado de Glucovainillina (g/100.g vaina.seca)
2.964	0.2400
3.226	0.2072
3.202	0.2143
3.327	0.1950
3.227	0.1972
3.105	0.2015
Promedio = 3.175	Promedio = 0.2092
D.S. = 0.1144	D.S. = 0.0151
% C.V. = 3.60	% C.V. = 7.2

Los resultados demuestran que la extracción alcohólica con soxhlet es reproducible y por lo tanto se puede utilizar como referencia para comparar la concentración de vainillina obtenida con los métodos enzimáticos propuestos, a pesar de que no se usa el mismo procedimiento. En el caso de la glucovainillina el coeficiente de variación es mayor probablemente por que se cuantifica de una forma indirecta y las concentraciones del compuesto son pequeñas. El método de soxhlet se ha reportado por ser el más eficiente en la extracción tanto de vainillina como de glucovainillina (Ranavide 1995), y se busca mediante la extracción enzimática mejorar el proceso de extracción a partir de vainas verdes de vainilla sin beneficiar.

Tradicionalmente el extracto se realiza dejando macerar la vaina beneficiada con etanol al 40% durante al menos 3 días. Si el tiempo de maceración es mayor se obtendra un producto con mejor calidad y rendimiento. Este método no se utilizó como referencia debido a que es menos eficiente.

Los extractos elaborados se analizaron en el HPLC, por lo que se pudo cuantificar la vainillina de acuerdo a la curva patrón elaborada, y se estimó el valor de glucovainillina por medio del estándar interno. En el método soxhlet la relación de vainillina:glucovainillina de 1:0.0672

Tratamientos enzimáticos

Para realizar los tratamientos enzimáticos fue necesario elaborar un control, es decir un extracto al cual no se le agregó enzima, pero se mantuvo en condiciones iguales a las extracciones enzimáticas.

Se hicieron extractos utilizando como materia prima la vainilla sin beneficiar. En el primero se incubaron 2g de vaina durante 8 horas a 50°C en 10ml de agua y se utilizó como control. Los resultados se compararon con la extracción tipo soxhlet (2g de vaina en 100ml de etanol 47.5% durante 8 horas)

Tabla VIII. Resultados de las extracciones de vainilla sin beneficiar, extracción acuosa (control) a una temperatura de 50°C y tipo soxhlet con etanol al 47.5% utilizando 2g de muestra.

METODO	% Vainillina (g/100g vaina seca)	Valor estimado de %Glucovainillina
Soxhlet	3.1689±0.1237	0.2105±0.0157
Control Agua	1.124±0.04829	0.1892±0.00294

En el fruto la vainillina se encuentra en forma de glucósido, sin embargo Ranavide (1992) identificó la presencia de vainillina en vainas mexicanas sin beneficiar. No obstante no se esperaba poder cuantificar vainillina en vainas verdes. En este caso la glucovainillina se pudo hidrolizar durante el almacenamiento, ya que a pesar de conservarse en refrigeración puede existir una mínima actividad de las enzimas.

La extracción tipo soxhlet fue más eficiente en cuanto a la extracción de vainillina, lo cual se pudo deber a que se utilizó una mezcla

de etanol/agua al 47.5% y esto mejoró la solubilidad de los compuestos. Este proceso puede presentar un mejor rendimiento debido a que la extracción se realiza con una mayor proporción de solvente respecto a los gramos de vaina, así mismo la mezcla de etanol/agua que baña continuamente a la materia prima tiene cero por ciento de soluto y está lejos del punto de saturación por lo que opera en condiciones óptimas.

A pesar de las diferencias de los dos métodos, soxhlet se utiliza como control positivo puesto que es el más eficiente, sin embargo se quiere desarrollar un proceso que inicialmente requiera menos solvente, tenga un mejor rendimiento y se pueda implementar con mayor facilidad.

La relación de vainillina:glucovainillina en el control elaborado con agua es de 1:0.168, es decir la concentración de glucovainillina es más alta que en la extracción con soxhlet (1:0.067), por lo tanto si esta se lograra hidrolizar se tendrían mejores rendimientos.

Se realizaron tratamientos enzimáticos, para lo cual se utilizaron dos tipos de enzimas con características similares.

Al comparar los resultados obtenidos, observamos que el control presenta las menores concentraciones de vainillina. Sin embargo en las extracciones enzimáticas se esperaba un mayor rendimiento y se obtuvieron valores son muy cercanos entre sí y al control. Debido a que Macerase y Viscozyme L son parecidas, ya que ambas provienen de cepas de *Aspergillus*, y trabajan en rangos muy cercanos de temperatura

y pH; se decidió escoger una de estas enzimas y en este caso fue Viscozyme L ya que se tiene mayor disponibilidad de la misma.

Los resultados de los tratamientos enzimáticos se presentan a continuación en la tabla IX

Tabla IX. Concentración de vainillina y glucovainillina obtenida por los métodos de macerace, viscozyme L y control. En todos los casos de usa como solvente agua y 2g de materia prima.*

METODO	% Vainillina (g/100g vaina seca)	Valor estimado de %Glucovainillina (g/100g vaina seca)
Macerase	1.0595±0.67500	0.4990±0.06430
Control Agua	1.1240±0.04829	0.1897±0.00294
Viscozyme L Agua	1.5185±0.08724	0.5243±0.04980

* En la gráfica 1 se muestran estos resultados

La relación de vainillina: glucovainillina cambio de acuerdo al tipo de extracción realizada, comportándose de la siguiente forma:

Macerase 1:0.470

Control 1:0.168

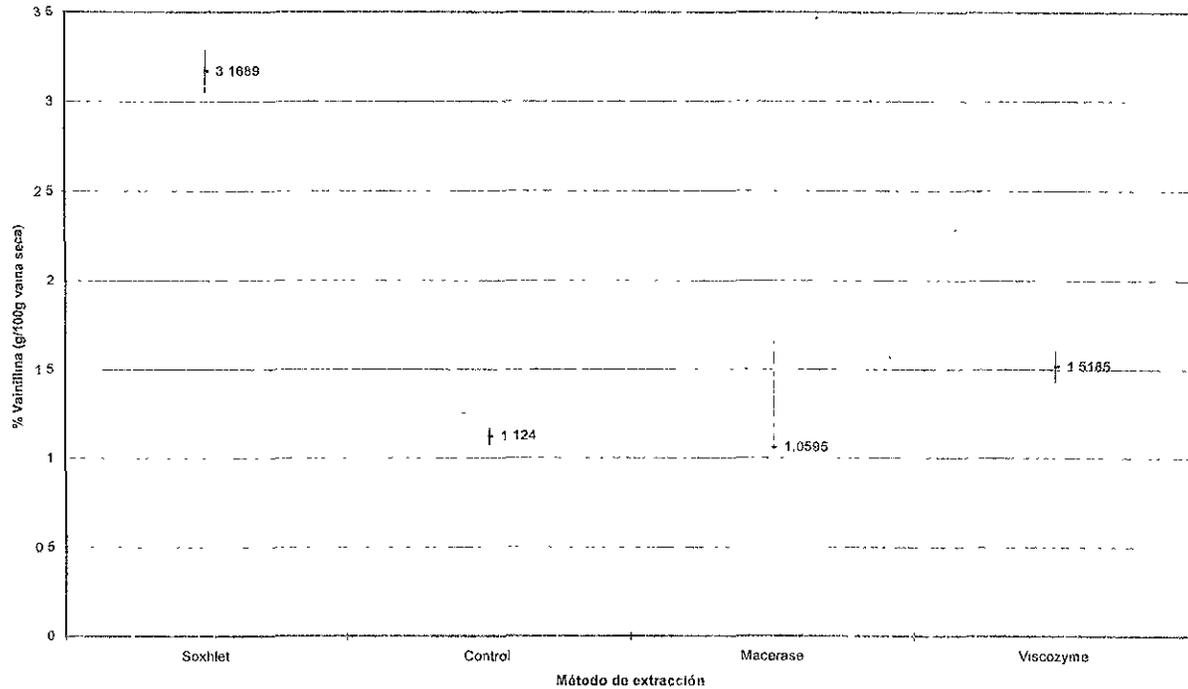
Viscozyme L 1:0.345

A pesar de que las concentraciones de vainillina obtenidas mediante las enzimas son cercanas al control, observamos que se mejoró la extracción enzimática de glucovainillina, por lo que es necesario optimizar las condiciones hidrólisis para aumentar los rendimientos.

Es importante mencionar que el residuo del pretratamiento enzimático se sometió a una extracción tipo soxhlet para verificar si contenían vainillina y glucovainillina, sin embargo en ningún caso se pudieron cuantificar estos compuestos, por lo que se decidió agregar etanol para mejorar la solubilidad.

A continuación se presenta la gráfica 1 en la cual se observa la cercanía entre los resultados de las extracciones enzimáticas y el control, así como la eficiencia de soxhlet en la extracción de vainillina.

Porcentaje de vainillina extraída por diferentes métodos a partir de vainas sin beneficiar



Gráfica 1. Resultados correspondientes a la Tabla IX.

Extracción alcohólica posterior al tratamiento enzimático.

Debido a que la vainillina tiene mayor solubilidad en etanol, se decidió realizar una extracción con este solvente. Después de hidrolizar la glucovainillina por medio del complejo enzimático de Viscozyme L incubando 2g de vaina durante 2 horas a 50°C, se agregó etanol para que el extracto quedara disuelto en una mezcla de etanol/agua al 50% y se maceró durante 8 horas. Con estas condiciones se pretendía aumentar la solubilidad del compuesto, dando como resultado una mayor concentración de vainillina ($1.95 \pm 0.3387\%$) en comparación al tratamiento con la misma enzima, pero sin la adición de alcohol ($1.5185 \pm 0.08724\%$).

En este caso se puede notar la presencia de glucovainillina disponible, por lo que podría ser hidrolizada por medio de la enzima correspondiente y obtener un mejor producto.

En los tratamientos realizados hasta el momento el más eficiente es el de soxhlet. Aunque en las extracciones enzimáticas se mejora el rendimiento al agregarle etanol, los resultados no son del todo favorables. Por lo tanto se realizaron las siguientes modificaciones: Se decidió aumentar el tamaño de muestra para disminuir errores procedentes de la misma y se observó que la solubilidad juega un papel determinante en la elaboración de un extracto por lo que al aumentar el tamaño de muestra se realizaron extractos tanto acuosos como alcohólicos en cada uno de los casos.

Tratamiento enzimático con 50g de muestra

Se elaboró un control, en el cual solamente se incubó la vaina (50g/150ml agua, 8 horas, temperatura 50°C), con una proporción vaina/agua de 1:3, obteniéndose una concentración de 1.07 ± 0.0449 g de vainillina/100g de vainas secas. Si este valor se compara con el resultado al realizar el control con 2g de materia prima en 10ml de agua, con una relación de 1g de vaina por cada 5ml de agua (1.124 ± 0.04829 g de vainillina/100g de vainas secas) vemos que son cercanos a pesar de la diferencia en el tamaño de muestra y de la proporción de agua respecto a la vaina utilizada.

En el caso de la preparación del control con 50g del fruto y la adición de etanol, para obtener un extracto con el 50% de alcohol, se logra una concentración de 2.1 ± 0.04084 g de vainillina/100g de vaina seca la cual aumentó en un 49% respecto al extracto acuoso.

Al desarrollar el extracto con Viscozyme L, el resultado obtenido es de 1.17 g de vainillina/100g de fruto seco y es menor al elaborado con 2g de vainas (1.5185 ± 0.087 %vainillina). Pero al agregarle alcohol el valor difiere, puesto que con 50g de muestra obtenemos 2.45% de vainillina; es decir un 20% de aumento respecto al valor con 2g de vainilla.

Por otra parte si la pared celular de la vaina está compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa probablemente sería necesario aumentar la concentración de las enzimas que degradan dichos compuestos y poder lograr un mayor contacto entre la

β -glucosidasa y la glucovainillina, por lo que se decidió realizar un tratamiento con otra enzima, llamada comercialmente Celluclast. Sin embargo la concentración de vainillina obtenida en este caso fue similar al tratamiento con Viscozyme L. Obteniendo en ambos una concentración de **1.17g** de vainillina/100g de vaina seca. Este valor es muy cercano al control con agua en 50g de muestra ($1.07 \pm 0.0449\%$ vainillina). Pero al agregar el alcohol la concentración de vainillina aumentó a **2.7 g/ 100g vaina**. En estos casos la solubilidad de la vainillina aumentó en promedio un 57% al adicionar etanol.

En todos los casos en que se realizó una extracción alcohólica posterior al tratamiento enzimático los resultados fueron favorables, debido a que se obtiene un mejor rendimiento.

Pese a las modificaciones, las concentraciones obtenidas eran menores al control positivo por lo que se realizó una prueba mezclando las enzimas. Se adicionó Viscozyme L y Celluclast (8 horas cada una 50g vaina/150ml agua, temperatura de 50°C, adicionándolas en el orden mencionado). Sin embargo, la concentración de vainillina era igual a cuando se utilizaron las enzimas por separado ($1.17 \pm 0.1915\%$) y al agregar el etanol ($2.6 \pm 0.2536\%$ vainillina) el valor era cercano al la extracción de Celluclast con etanol ($2.7 \pm 0.215\%$ vainillina). Por lo tanto no se puede considerar un extracción eficiente si se están usando dos enzimas y obteniendo los mismos resultados. A pesar de ello se decidió invertir el orden, es decir se añadió primero Celluclast y luego Viscozyme L (mismas condiciones que el extracto anterior) y el rendimiento aumentó

ya que probablemente al agregar primero Viscozyme L los subproductos de la reacción, como pueden ser los fenoles o sustancias tóxicas producto de la degradación de los azúcares, podrían inhibir a Celluclast y en ese caso se afectaría el orden de adición de las enzimas. Si comparamos los resultados de estos dos procesos, vemos que en el tratamiento con Viscozyme L y Celluclast en medio acuoso el porcentaje de vainillina era del 1.17 ± 0.1915 g/100g de vaina seca contra 2.3 ± 0.37 g/100g de vaina seca obtenidos al invertir el orden de las enzimas; es decir existe una diferencia del 49% en la concentración de vainillina obtenida.

Al agregarle alcohol aumentó la concentración de vainillina del extracto a un 3.6% en base seca al incubar Celluclast durante 8 horas, posteriormente Viscozyme L 8 horas, siendo esta la extracción más eficiente.

Tabla X. Comparación de las extracciones realizadas con dos tamaños de muestra diferentes con varios métodos. Porcentaje de vainillina.*

MÉTODO	% Vainillina (g/100g vaina seca) 2g vaina	% Vainillina (g/100g vaina seca) 50g vaina
Macerase	1.0595±0.675	no determinado
Soxhlet	3.1689±0.1237	no determinado
Control Agua	1.124±0.04829	1.07±0.0449
Viscozyme L Agua	1.5185±0.08724	1.17±0.0437
Celluclast Agua	no determinado	1.17±0.0592
Viscozyme L con Celluclast Agua	no determinado	1.17±0.1915
Celluclast con Viscozyme L Agua	no determinado	2.3±0.37
Control Etanol	no determinado	2.1±0.4084
Viscozyme L Etanol	1.9587±0.3387	2.45±0.1113
Celluclast Etanol	no determinado	2.7±0.215
Viscozyme L + Celluclast Etanol	no determinado	2.6±0.2536
Celluclast con Viscozyme L Etanol	no determinado	3.6±0.489

*En las gráficas 2 y 3 se muestran estos resultados Porcentaje de vainillina obtenido utilizando 2g y 50g de muestra, mediante viscozyme, celluclast, control, viscozyme + celluclast, y celluclast + viscozyme y soxhlet.

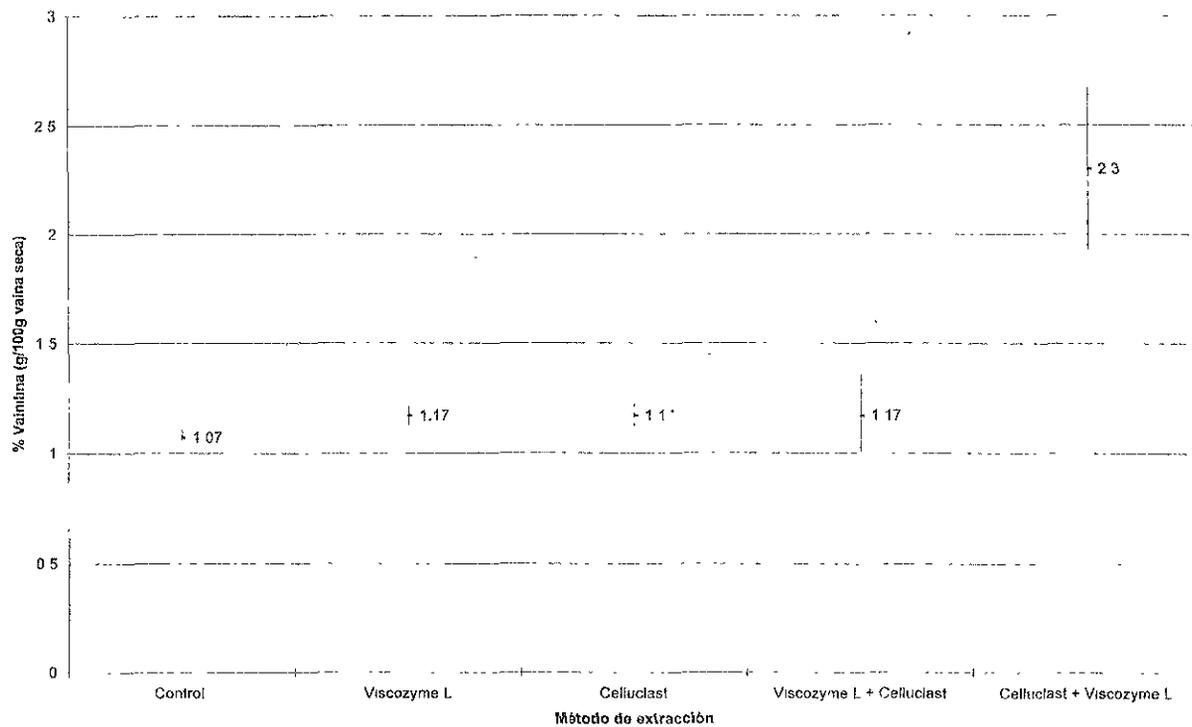
Tabla XI. Comparación de las extracciones realizadas con dos tamaños de muestra diferentes con varios métodos. Porcentaje de glucovainillina. *

MÉTODO	Valor estimado %Glucovainillina (g/100g vaina seca) 2g vaina	Valor estimado %Glucovainillina (g/100g vaina seca) 50g vaina
Macerase	0.499±0.0643	no determinado
Soxhlet	0.2151±0.017	no determinado
Control Agua	0.1897±0.00294	0.2107±0.00449
Viscozyme L Agua	0.5243±0.0498	0.1141±0.0437
Celluclast Agua	no determinado	0.1003±0.0071
Viscozyme L con Celluclast Agua	no determinado	0.055±0.001915
Celluclast con Viscozyme L Agua	no determinado	0.08552±0.00263
Control Etanol	no determinado	0.641±0.04216
Viscozyme L Etanol	0.3150 ± 0.067	0.1401±0.0013
Celluclast Etanol	no determinado	0.1299±0.005
Viscozyme L + Celluclast Etanol	no determinado	0.0761±0.00182
Celluclast con Viscozyme L Etanol	no determinado	0.0118±0.00140

*Porcentaje de glucovainillina obtenido utilizando 2g y 50g de muestra, mediante viscozyme, celluclast, control, viscozyme + celluclast, y celluclast + viscozyme y soxhlet.

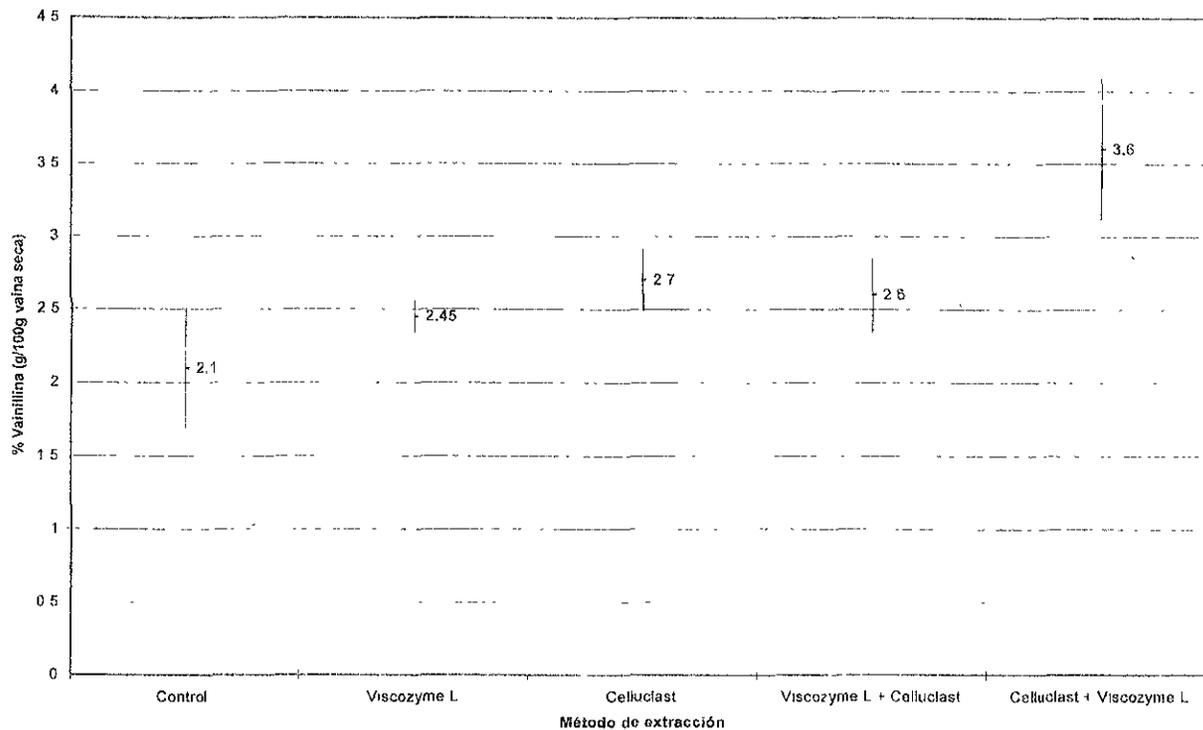
La eficiencia del método se muestra de una manera más clara en las gráficas 2 y 3 que se presentan a continuación.

Evaluación de diferentes métodos de extracción de vainillina en vainas sin beneficiar, usando como solvente agua



Gráfica 2. Resultados correspondientes a la Tabla X.

Evaluación de diferentes métodos de extracción de vainillina en vainas sin beneficiar, usando como solvente etanol al 50%



Gráfica 3. Resultados correspondientes a la Tabla X.

Finalmente, dado que el almacenamiento puede influir en la concentración de vainillina presente en la vaina verde, por la presencia de β -glucosidasa en las vainas, se repitió la extracción en un lote nuevo de vainas verdes (Lote 2 ver materiales y métodos), estas no presentaban obscurecimiento enzimático ya que tenían 2 días de haber sido cortadas. Para esto se elaboraron extractos por medio de soxhlet (etanol 47.5% durante 8 horas) y por otra parte se trataron con Celluclast durante 8 horas y con Viscozyme L otras 8 horas, inmediatamente después se le agregó etanol para obtener una solución al 50%. Por otra parte se realizó una extracción tipo soxhlet a partir de vainilla beneficiada (Lote 3 ver materiales y métodos), perteneciente a la misma planta beneficiadora que la vaina verde, para que de esta forma se pueda comparar diferencia en el rendimiento entre el método artesanal y por medio de una biotransformación. Reportando los resultados de la tabla XII.

Tabla XII. Comparación de la concentración de vainillina y el valor estimado de glucovainillina presente en vaina beneficiada (Lote 3), sin beneficiar (Lote 2), y en la extracción enzimática/ alcohólica con vaina verde.

Método	% Vainillina (g/100g vaina seca)	% Vainillina (g/100g vaina seca) respecto a soxhlet en vaina beneficiada	Valor estimado %Glucovainillina (g/100g vaina seca)
Soxhlet vaina beneficiada	1.14±0.043	100	0.1289±0.00075
Soxhlet vaina verde	0±0.0	0	3.8874±0.04675
Control agua	0±0.0	0	1.3324±0.02805
Control Etanol	0±0.0	0	1.5268±0.0303
Celluclast con Etanol 50% vaina verde	2.66±0.035	233.33	0.1299±0.0050
Celluclast con Viscozyme L y Etanol 50% en vaina verde	3.66±0.038	321.05	0.0118±0.0014

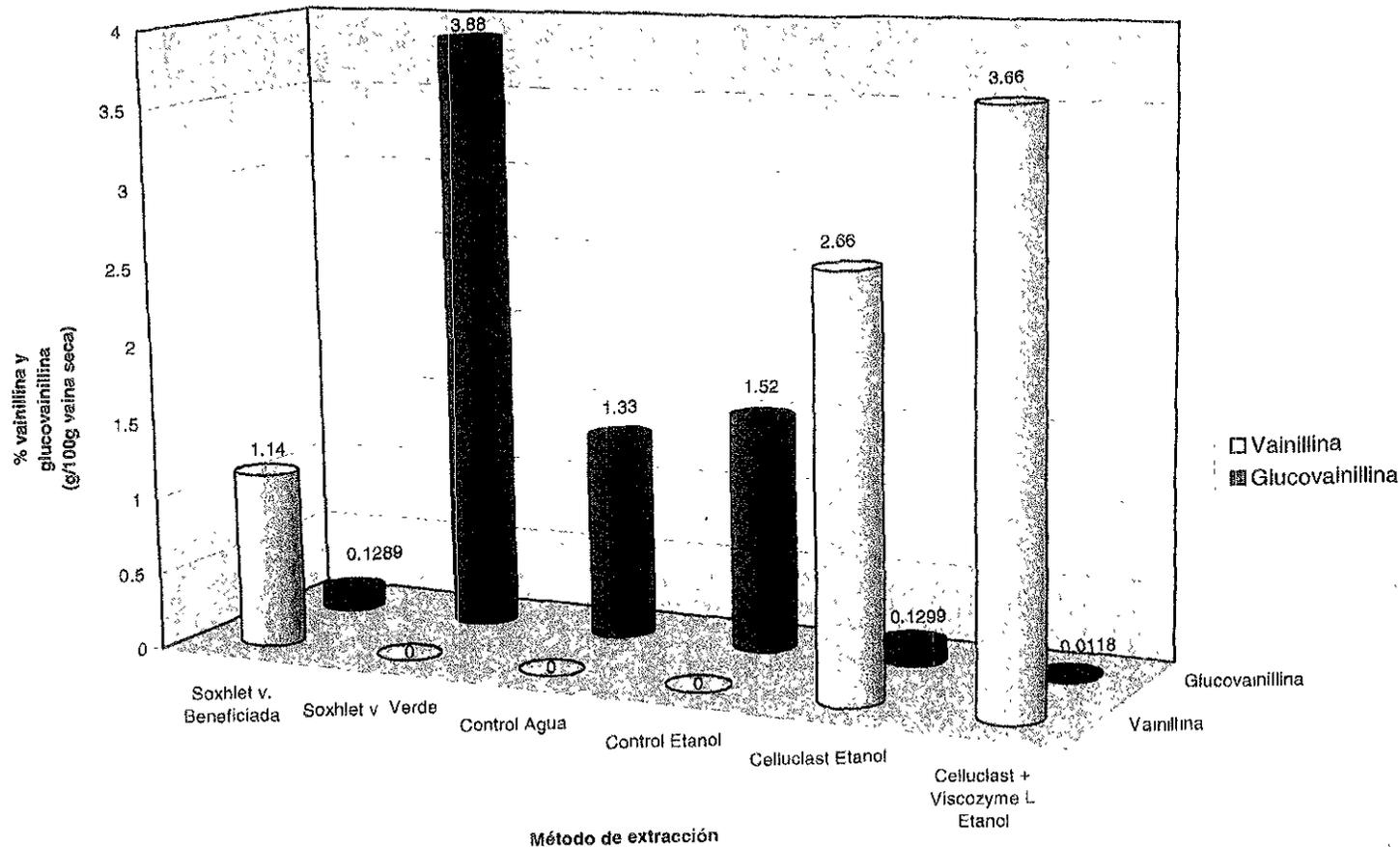
En la gráfica 4 a se muestran estos resultados.

Los resultados muestran que en vainas sin beneficiar no se detectó vainillina sino únicamente glucovainillina, mientras que utilizando un tratamiento enzimático se puede obtener un extracto con mayor concentración de vainillina, incluso respecto al extracto alcohólico elaborado con soxhlet a partir de vainas beneficiadas. El 94.32% de la glucovainillina cuantificada en la extracción por soxhlet se hidrolizó para obtener la vainillina cuando se realizó el extracto enzimático por medio de Celluclast y Viscozyme L en alcohol al 50%.

En el control no se cuantificó vainillina y la concentración de glucovainillina determinada fue menor que en soxhlet.

Para verificar lo anterior, en la gráfica 4 que se encuentra a continuación, se muestran los valores y se ve claramente que la extracción de Celluclast con Viscozyme L en etanol es la más eficiente para obtener un extracto a partir de vainas verdes, aunque en el método de soxhlet la glucovainillina se obtiene de una manera eficaz, no se logra hidrolizar por lo que para este fin es necesaria la presencia de las enzimas incubadas en un orden específico y posteriormente la extracción alcohólica.

Porcentaje de vainillina y glucovainillina obtenida por diferentes métodos de extracción



Gráfica 4. Resultados correspondientes a la Tabla XII.

CONCLUSIONES.

A una longitud de onda de 278nm se pueden detectar la vainillina y la glucovainillina.

El método utilizado por HPLC permite identificar y cuantificar tanto a la vainillina como a la glucovainillina.

La glucovainillina se puede encontrar tanto en vainas beneficiadas como sin beneficiar.

La vainillina, está presente principalmente en las vainas beneficiadas, aunque se detectó en frutos verdes sin beneficiar almacenados a 4°C.

Las enzimas comerciales Viscozyme L y Celluclast son capaces de hidrolizar a la glucovainilla, ya que presentan actividad β -Glucosidasa. Pueden ser utilizadas para la elaboración de extractos de vainilla a partir de frutos verdes sin beneficiar.

La glucovainillina y la vainillina presentan una mejor solubilidad en etanol al 50%.

El método de extracción más eficiente a partir de vainas verdes fue utilizando una combinación de Celluclast y Viscozyme L (adicionadas en este orden). El fruto se incubó 8 horas en presencia de Celluclast y posteriormente con Viscozyme L en las mismas condiciones. Una vez

llevada a cabo la hidrólisis de la glucovainillina se realizó una extracción con etanol hasta obtener el producto final con el 50% de alcohol y una concentración de 3.56g de vainillina/100g de vaina seca. Es importante señalar que en vainas beneficiadas originarias de México el valor promedio de vainillina reportado es del 1-1.5%, por lo que el rendimiento se aumentó y es posible elaborar un extracto evitando el proceso de beneficio y con ello el tiempo que implica.

La obtención de un producto de mayor calidad aumentando la concentración de vainillina podría producirse utilizando vainas beneficiadas, con la ayuda de las enzimas Viscozyme L y Celluclast y se podría hidrolizar la glucovainillina que no alcanzó a transformarse durante el beneficio.

ANEXOS

Anexo I

Preparación de los estándares de etilvainillina y vainillina.

Los estándares que se utilizaron fueron: etilvainillina y vainillina.(Sigma)

La glucovainillina se determinó de forma indirecta, ya que no hay estándares en el mercado, se cuantificó mediante una relación de áreas con el estándar interno (etilvainillina) y el area obtenida de la glucovainillina.

Se pesaron 0.12g del estándar y se aforaron a 100ml con la fase móvil a utilizar en el cromatógrafo (Metanol : Agua 40:60 pH de 4)

Preparación de la curva patrón de vainillina y etilvainillina.

La curva patrón de etilvainillina y vainillina se preparó con las siguientes concentraciones:

Tabla XIII. Preparación de curva patrón

ml de sol stock	Concentración (mg/ml)
0.2	0.024
0.4	0.048
0.5	0.06
0.7	0.084
1.0	0.12

Tabla XIV. Áreas obtenidas a partir de las soluciones de vainillina y etilvainillina realizadas.

Concentración (mg/ml)	Vainillina (areas)	Etilvainillina (areas)
0	0	0
0.0.24	54.16	45.20
0.048	74.00	75.48
0.06	105.45	86.81
0.084	128.72	112.01
0.12	179.82	146.96
	r = 0.9918	r = 0.989
	A = 9.248	A = 11.1906
	B = 1448.429	B = 1188.4770

Anexo II***Preparación de la curva patrón de glucosa.***

Curva patrón de glucosa (Sigma). Se realizó a partir de una solución stock de glucosa con una concentración de 2mg/ml

Tabla XV. Curva Patrón.

ml de sol stock	Concentración (mg/ml)
0.25	0.05
0.5	0.1
1	0.2
2	0.4
3	0.6
4	0.8
5	1.0

ANEXO III

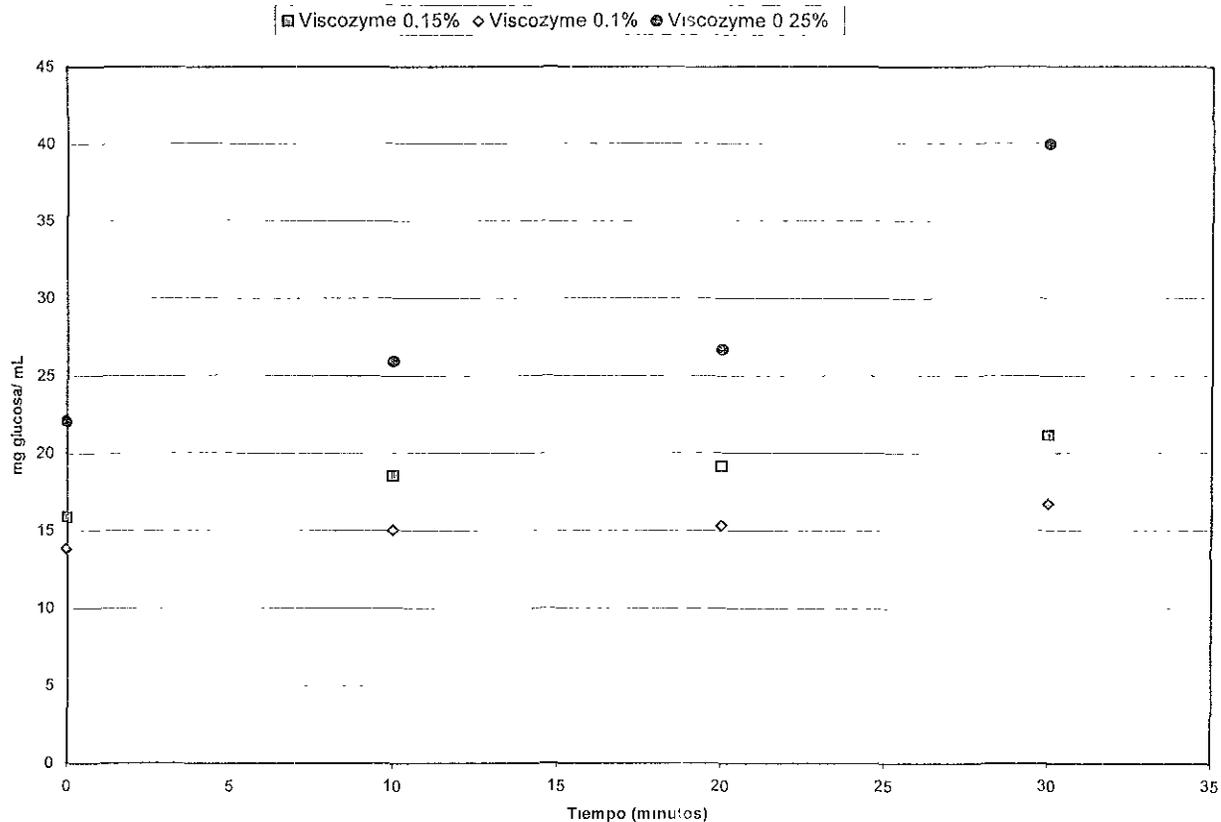
Determinación de la actividad específica de Celluclast

Tabla XVI. Determinación de la actividad específica de Celluclast. *

Concentración de enzima μL	Pendiente Mg glu/ml min	Coefficiente de regresión	Actividad específica $\text{mg glu}/\mu\text{L E min}$
10	0.0542	0.998	0.00542
15	0.082	0.964	0.0054
25	0.1027	0.965	0.00408

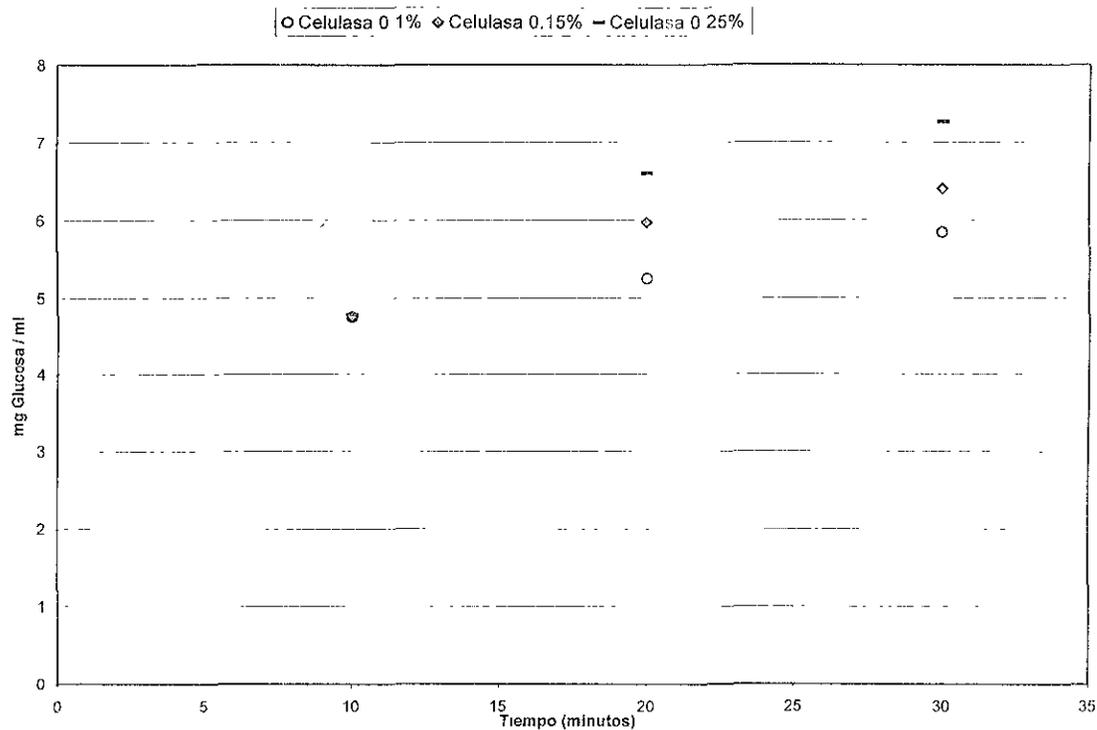
* En la gráfica 6 se muestran estos resultados.

Determinación de la actividad específica de Viscozyme L empleando como sustrato celobiosa



Gráfica 5. Resultados correspondientes a la Tabla V.

Determinación de actividad específica de Celluclast empleando como sustrato celobiossa



Gráfica 6. Resultados correspondientes a la Tabla XVI.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. **Methods of Analysis**, 13th ed . Association of Official Analytical Chemist: Washington, D.C. 1980. Method 19.030, p 310.
- Arana. F.E. 1943 **Action of Betaglucosidase in the Curing of Vanilla**. Food Research 8, 343-351
- Arana. F. E. 1944 **Vanilla Curing and its Chemistry**. USDA Federal Expmt. Stn. Mayaguez, Puerto Rico, Boletín No 42 de 1939 pp. 2-14, USDA Washington D.C.
- Bricout J.; Fontes J.C. and Merlivat L. 1974 **Detection of Synthetic Vanillin in Vanilla Extracts by Isotopic Analysis**. Journal Association Official Agricultural Chemist, 57 (3), 713-715
- Brunerie. Jan 6 1998. **Process for the Production of Natural Vanilla Extracts by Enzymatic Processing of Green Vanilla Pods, and Extract thereby Obtained**. United States Patent, number 5,705,205
- Cruz Sánchez A. Marzo 1998 **Rechaza el Consejo Indígena apoyar EZLN, UNO MAS UNO**.
- Culp, R. A.; Randolph y Noakes, J. E. 1992 **Determination of Synthetic Components in Flavors by Deuterium / Hydrogen Isotopic Ratios**. Journal of Agricultural Food Chemistry, 40, 1892-1897.
- Curti 1995. **Cultivo y beneficio de la vainilla en México. Organización de Vainilleros Indígenas. México**.
- Funk C and Brodeliust P. 1990 **Influence of Growth with Regulators and an elicitor on Phenylpropanoid Metabolism in Suspension Cultures of *Vanilla Planifolia***. Phytochemistry ,29 (3), 845-848.
- Galetto G. y Hoffman P. 1978. **Some Benzyl Ethers present in the Extract of Vanilla (*Vanilla planifolia*)**. Journal of Agricultural Food Chemistry, 26 (1), 195-197.
- Goris, M. A. 1947. **Formation du Parfum de la Vanille**. Ind Parfumerie, 2,4.

- Hoffman G. y Saib M. 1979. **Isolation and Stable Ratio Analysis of Vanillin**. Journal of Agricultural Food Chemistry, 27 (2), pp 352.
- Holman, R.T. 1972. **Characterization of the Lipids of Some Orchids**. Phytochemistry. 11, 333-337.
- International Organization of the Flavor Industry **Information Letter**, 1989; No 775. Referida en Kaunzinger A. 1997
- Jurgens, U. 1981 **The vanillin/p-hydroxybenzaldehyde Ratio in Bourbon Vanilla**. Lebensmittelchem. Gericht. Chem. 35 (5), 97
- Kaunzinger A.; Juchelka D. and Mosandl A. 1997. **Progress in the Authenticity Assessment of Vanilla. 1. Initiation of Authenticity Profiles**. Journal of Agricultural Food Chemistry. 45, 1752-1757.
- Kenney F. 1990. **Applications of High-Performance Liquid Chromatography for the Flavor Research and Quality Control Laboratories in the 1990s**. Journal of Food Technology. September, 76-84.
- Krueger D. y Krueger H. 1983. **Carbon Isotopes in Vanillin and the Detection of Falsified "Natural" Vanillin**. Journal of Food Chemistry, 31, 1265-1268.
- Krueger D. y Krueger H. 1985. **Detection of Fraudulent Vanillin Labeled with ^{13}C in the Carbonyl**. Journal of Agricultural Food Chemistry 33 (3) 323-325.
- Klimes, I. Lamparsky D. Nov 1976 **Vanilla Volatiles A Comprehensive Analysis**, Int Flav Food Additives. 272
- Lamprecht G.; Pilchmayer, F. y Schmid E. R. 1994. **Determination of the Authenticity of Vanilla Extracts by Stable Isotope Ratio Analysis and Component Analysis by HPLC**. Journal of Agricultural Food Chemistry 42 (8), 1722-1727.
- Leong-G; Archavlis-A, Derbesy-M. 1989. **Research on the Glucoside Fraction of the Vanilla Bean**. Journal of Essential Oil Research 1 33-41.

- Lesage - Messen L. 1996. **A two- step Bioconversion Process for Vanillin Production from Ferulic Acid Combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*.** Journal of Biotechnology 50, 107-113.
- Lorenz Miller G. 1959 **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry 31 (3), Marzo 1959
- Martin, M.W. Ethridge y F.E. Kraiser. 1977. **Determining the Authenticity of Vanilla Extracts.** J. of Food Science. 42 (6), 1580.
- Mane J., Zucca J. 1993 **Process for Production of Natural Vanilla Flavor by Treatment of Vanilla Pods and Vanilla Flavour so Produced.** French Patent Application PN FR 2 691 880 A1
- Mancilla Ascencio C. L. 1997 **La vainilla un recurso mexicano: Potenciales de explotación y estrategias de aprovechamiento.** Tesis Química Farmacéutica Bióloga, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Rakotoarison. T 1995 **World Market for Vanilla RAP.** Market Information. Bulletin No 7. July
- Ramaroson-Roanizafinimanana B. 1997. **Hydrocarbons from three vanilla bean species: *V. fragans*, *V. madagascariensis*, and *V. tahitensis*.** Journal of Agricultural Food Chemistry. 47, 2542-2545.
- Ranavide A. S. Szkutnica, K. Guerrero, J.G. y Frenkel, C. 1983 **Vanillin Biosynthesis in Vanilla Beans** Proceeding of the 9th International Congress of Essential Oils, Singapore, Allured. Publishing, Wheathon IC. Book 2, 147.
- Ranavide A. S. 1992. **Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins.** Journal of Agricultural Food Chemistry 40, 1992-1924
- Ranavide A. S. 1994. **Cultivation, Curing, Chemistry, Technology and Commercial Products.** Spices, Herbs and Edible Fungi. Elsevier Science B.V.

- Riley K. A. y Kleyn D. H. October 1989. **Fundamental Principles of Vanilla/ Vanilla Extract Processing and Methods of Detecting Adulteration in Vanilla Extracts.** Food Technology. 64-67
- Sagrero-Nieves, L. y Schwartz S. J. 1988 **Phenolic Contents of Vanilla planifolia as Affected by Harvest Period.** Journal of Food Composition and Analysis. 1, 362.
- Tabata M. y Yasuko U. 1988. **Glucosylation of phenolic compounds by plant cell cultures.** Phytochemistry, 27 (3), 809-813.
- Takashi K. Hidenori T. Takahisa N. y Shigetaka O. 1993. **Glucosylation of vanillin by Cultured Plants cells.** Bioscience Biotechnology Biochemistry. 52 (8),1290-1293.
- Todd H. Zink y Triest. 1998. SARL **The North American Market for Vanilla,** Perfumer & Flavorist. Vol 23.
- Voisine R. 1995. **Determination of Glucovanillin and vanillin in Cured Vanilla Pods.,** Journal of Agricultural Food Chemistry 43, 2658-2661
- Wild-Altamirano. **Enzymic Activity during growth of Vanilla Fruit, 1. Proteinase, glucosidase, Peroxidase and Poliphenoloxidase,** Journal of Food Science Vol 69, 235
- Winkler, F.J. Schmidt, H.L. 1980. **Application Possibilities of ¹³C-isotope Mass Spectrometry in food Analysis.** Z. Lebensm Unters Forsh. 171, 85-94.

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño le dedico este trabajo a:

A mi mamá y a mi papá

A Marícruz y Manuel

Y especialmente a José Roberto.

A todos mis amigos que me acompañaron a lo largo de la carrera.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me ayudaron en la elaboración de la tesis, a Pancho, a Agustín López-Munguía y a los miembros del jurado por sus valiosas opiniones.

Agradezco especialmente a Julieta por todo su apoyo y enseñanzas.