



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN DE  $\beta$ -GLUCOSIDASA DE VAINAS DE VAINILLA Y MEDICIÓN  
DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**GÓMEZ CRUZ BEATRIZ GUADALUPE**



**CDMX**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:**           **Profesor: Marina Gavilanes Ruiz**

**VOCAL:**                   **Profesor: María del Pilar Cañizares Macías**

**SECRETARIO:**           **Profesor: Silvia Citlalli Gama González**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Armando Arciniega Corono**

**2° SUPLENTE:**         **Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 111 EDIFICIO F - ANÁLISIS POR INYECCIÓN DE FLUJO**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

---

**María del Pilar Cañizares Macías**  
**ASESOR**

---

**Gómez Cruz Beatriz Guadalupe**  
**SUSTENTANTE**

## Índice

I.- Resumen.....	6
II. Marco teórico .....	7
Historia de la vainilla .....	7
Producción de vainilla a nivel mundial y nacional.....	7
Botánica.....	9
Condiciones ambientales para el crecimiento y producción de vainilla .....	10
Morfología de la vaina.....	10
Proceso de curado.....	12
Marchitado .....	13
Sudado .....	14
Secado .....	14
Acondicionamiento .....	15
Cinética enzimática.....	15
Efectos de la temperatura y del pH .....	16
Modelo de Michaelis-Menten .....	17
$\beta$ -Glucosidasa .....	20
Principio de la reacción enzimática .....	22
Proteasas .....	23
III. Objetivos.....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares .....	24
IV. Metodología .....	25
IV.1 Reactivos y disoluciones.....	25

IV.2 Equipo e instrumental.....	26
IV.3 Curva de calibración de p-nitrofenol.....	26
IV. 4 Evaluación de la cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa comercial de almendra purificada .....	27
IV.5 Elaboración de extractos enzimáticos a partir de vainas verdes de vainilla.....	27
IV.6 Curva de calibración de $\beta$ -glucosidasa de almendra purificada .....	28
IV.7 Cuantificación de Unidades de Enzima de $\beta$ -glucosidasa en vainas verdes de vainilla	29
IV.8 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas verdes de vainilla .....	29
IV. 9 Curva de calibración de proteasa comercial purificada .....	29
IV.9.1 Cuantificación de proteasas en vainas de vainilla.....	30
IV. 10 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa comercial purificada bajo la influencia de una proteasa comercial purificada.....	31
IV. 11 Evaluación de la actividad de las enzimas $\beta$ -glucosidasa y proteasas y concentración de vainillina durante el proceso de curado en las vainas de vainilla .....	31
IV.11.1 Actividad de $\beta$ -glucosidasa.....	31
IV.11.2 Actividad de proteasas.....	32
IV.11.3 Concentración de vainillina .....	32
V Resultados y Discusión .....	34
V. 1 Curva patrón de p-nitrofenol .....	34
V.2 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras .....	35
V. 3 Elaboración de extractos enzimáticos a partir de vainas de vainilla.....	37
V. 4 Curva de calibración de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras .....	40
V. 4.1 Cuantificación de $\beta$ -glucosidasa en vainas de vainilla verdes.....	42
V.5 Curva de calibración de proteasa.....	43

V.5.1 Cuantificación de proteasa en vainas verdes de vainilla .....	43
V.6 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra bajo la influencia de proteasa purificada de <i>Aspergillus oryzae</i> . .....	44
V.7 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas verdes de vainilla .....	45
V.8 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa, proteasas y concentración de vainillina durante el proceso de curado .....	47
V.8.1 Actividad de $\beta$ -glucosidasa.....	47
V.8.2 Actividad de proteasas durante el proceso de curado .....	49
V.8.3 Concentración de vainillina durante el proceso de curado .....	50
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexo A .....	57

## I.- Resumen

La vainilla es una orquídea tropical originaria de México, su fruto es una vaina que al estar verde carece de sabor y aroma, por lo que es necesario someterla a un proceso de curado. Durante este proceso se llevan a cabo reacciones químicas y bioquímicas que dan como producto compuestos volátiles responsables del aroma, el más importante de ellos es la vainillina. La enzima  $\beta$ -glucosidasa interviene en el proceso de obtención de vainillina hidrolizando el enlace  $\beta$  de glucovainillina liberando glucosa y vainillina.

En este trabajo se elaboraron extractos de vainas de vainilla verdes en los cuales se evaluó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa. Para estudiar el comportamiento de la enzima se utilizó el modelo matemático de Michaelis-Menten y se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ , los cuales fueron comparados con los valores de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra comercial. Se utilizó un sustrato artificial, 4-nitrofenil-  $\beta$ -D- glucopiranosido (4PNG), el cual por acción de  $\beta$ -glucosidasa libera 4-nitrofenol, un compuesto colorido a pH básico el cual se cuantificó por medio de un espectrofotómetro UV-VIS. Se encontró que la enzima de las vainas de vainilla es más específica al sustrato que la enzima purificada de almendras.

Durante el proceso de curado tradicional de las vainas, la enzima  $\beta$ -glucosidasa no se encuentra en condiciones óptimas de pH y temperatura, así que se imitaron las condiciones del proceso de curado. Las vainas fueron sometidas al marchitado por inmersión en agua a 80°C 15 minutos y al sudado por almacenamiento de las vainas a 40°C durante 13 días en los cuales se utilizando el pH al que la enzima es más específica, se determinó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa, la actividad de las proteasas nativas de la vaina y la concentración de vainillina. Independientemente una vaina adicional previo al marchitamiento fue sumergida en una solución búfer de acetatos pH 4 durante 15 minutos. Se observó que el decremento en la actividad de  $\beta$ -glucosidasa es más evidente a partir del día 6, lo cual coincide con el día de actividad máxima de las proteasa. También se determinó que al someter las vainas verdes a pH 4 previo al proceso de curado aumentó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa sin embargo el contenido de vainillina de las vainas no presentó un aumento significativo.

## **II. Marco teórico**

La vainilla es un legado gastronómico que México dio al mundo (Curti-Díaz, 1995). Después del azafrán es la especia más costosa (Krushnamurthy, 2013) y hoy en día es considerada como el saborizante de mayor importancia en el ámbito mundial.

Su uso se distribuye en diversas industrias, que van desde la alimentaria, pasando por la licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera, hasta llegar incluso, a la industria artesanal (COVECA, 2010).

### **Historia de la vainilla**

En el siglo XIII, el imperio azteca conquistó territorio totonaco obligando a sus habitantes al pago de diversos tributos, entre los cuales se encontraba el fruto de la vainilla o flor negra. Fue Moctezuma quien invitó a Hernán Cortés a tomar una bebida especial para los dioses denominada “xocolatl”, que se preparaba con semillas de cacao en polvo y vainilla molida (Cid-Pérez, 2011).

Los españoles se impresionaron con el sabor de la vainilla así que en 1520 enviaron a España vainas de vainilla y posteriormente, en 1733, a otros países europeos. Sin embargo durante 350 años México siguió siendo el único productor de vainilla. En lugares con climas similares como las islas de Java, Mauricio y Madagascar se llevaron las plantas y, aunque se produjo floración, la fructificación no tuvo lugar debido a la ausencia de polinizadores naturales (abeja milipona y/o pájaro colibrí). Fue hasta el año de 1841 cuando Edmond Albuis desarrolló un método práctico de la polinización artificial (Krushnamurthy, 2013).

### **Producción de vainilla a nivel mundial y nacional**

Debido a la polinización artificial, México dejó de ser desde hace varias décadas el principal productor de vainilla y hasta el año 2012 México ocupó el sexto lugar en su producción. En la Figura 1 se muestra la producción de vainilla en toneladas de los 6 países productores mayoritarios durante el año 2012.

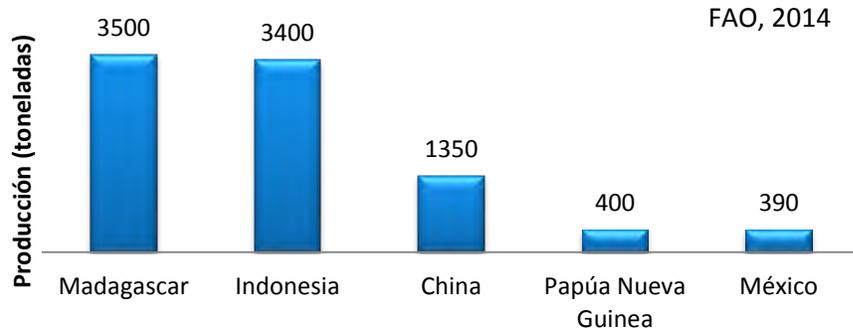


Figura 1. Productores de vainilla (ton) en el mundo durante el año 2012.

La Figura 2 muestra la producción nacional de vainilla durante el periodo del 2000 al 2012. El máximo de producción se encuentra en el año 2007 cuando hubo una producción de 637 toneladas

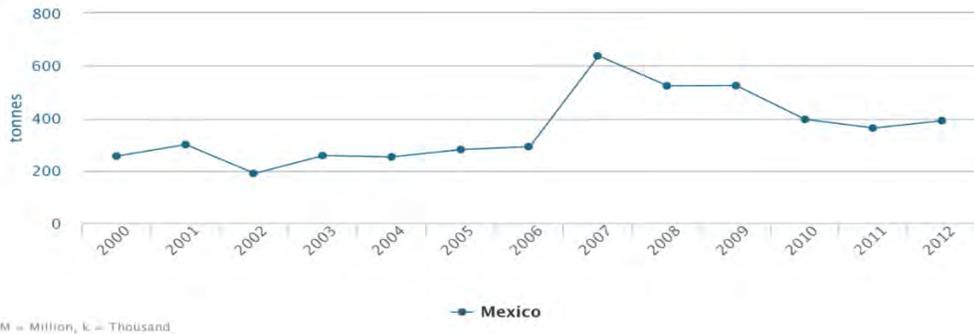


Figura 2. Producción de vainilla (ton) en México durante el periodo 2000 – 2012.

La producción de vainilla en nuestro país durante el año 2012 fue de 390.33 toneladas, en la Figura 3 se muestran los estados en los cuales la producción de vainilla fue mayor.

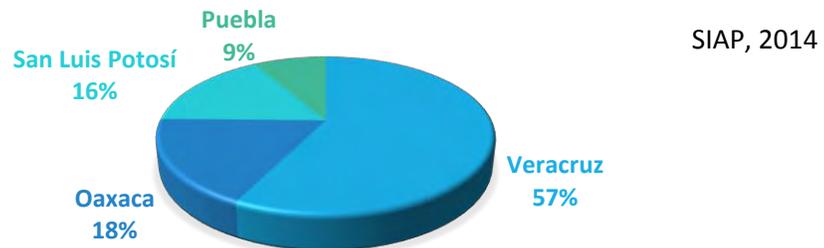


Figura 3. Estados con mayor producción de vainilla en México durante el 2012.

La vainilla, al igual que muchos otros recursos naturales de México, es sobreexplotada y subutilizada. Sobreexplotada porque las poblaciones silvestres han sido diezgadas con la colecta excesiva para establecer plantaciones hasta el punto de que la especie está en peligro de extinción. Subutilizada porque no se ha hecho un uso adecuado de este cultivo, pues sólo se produce cerca de 4% de la producción mundial y no se ha sabido aprovechar la mayor ventaja sobre los demás países: la diversidad genética de la especie para hacer fitomejoramiento (Soto, 2006).

### **Botánica**

La vainilla es una orquídea nativa de México del género *Vanilla* (familia: Orquidaceae), de la cual existen un total de 110 especies. Sin embargo, sólo tres de éstas tienen importancia comercial debido a que producen frutos comestibles: *V. planifolia* Andrews o *V. fragans* (vainilla mexicana o genuina); *V. tahitensis* JW Morre (vainilla de Tahití) y *V. pompona* (vainilla del oeste de la India). Siendo la variedad *V. planifolia* más cultivada para la obtención de vainas de vainilla (Cid-Pérez, 2011).

Esta orquídea es perenne, tropical, de hábitos trepadores, que alcanza hasta 50 metros de longitud (Pacheco, 2009). Las flores se presentan en racimos conocidos como “macetas” y brotan de las hojas; la planta llega a tener de 10 a 15 racimos de flores compuestos cada uno por más de 10 flores individuales, las cuales son de color aperlado, blanco-amarillento y al ser polinizadas dan lugar a un fruto carnoso de 15 a 25 cm de longitud.

El fruto o vaina de vainilla es una cápsula dehiscente (se abre al madurar para liberar las semillas), que presenta tres costados convexos, en forma cilíndrica, de color verde brillante y se torna de verde a amarillo y posteriormente a café a medida que madura (COVECA, 2010).

## **Condiciones ambientales para el crecimiento y producción de vainilla**

- **Temperatura:** Los parámetros de temperatura para el desarrollo adecuado de la vainilla son de 21 a 32°C, con temperaturas mínimas de 5 a 7°C por un corto tiempo.
- **Altitud:** La vainilla prospera mejor desde a nivel del mar hasta 600 metros sobre el nivel de mar.
- **Precipitación:** Una precipitación media anual de 1,500 a 2,000 mm anuales, con una buena distribución a través del año.
- **Suelo:** Es muy importante que el terreno seleccionado para plantar la vainilla cuente con un buen drenaje, debe ser rico en materia orgánica y tener un pH de 6 a 7.

El hábito trepador de la planta demanda de un patrón o tutor para darle sostén y proporcionarle la cantidad de luz necesaria para un buen desarrollo. Se requiere que la sombra permita una humedad relativa del 80% y una buena ventilación de las plantas.

Desde la plantación hasta la floración, transcurren de dos a tres años y a partir de entonces, la floración se presenta cada año en función del tipo de manejo que se le dé a la plantación de vainilla, del origen del material vegetativo de propagación y de las condiciones ambientales (COVECA, 2010).

### **Morfología de la vaina**

El fruto de la vainilla tiene una sección transversal triangular, con una cavidad central que contiene miles de minúsculas semillas, siendo la parte carnosa la que se utiliza para elaborar el saborizante (Pacheco, 2009).

Hay dos zonas en el fruto que son importantes para el desarrollo del sabor:

I La pared del fruto o región verde, la cual incluye la epidermis y tejidos vasculares, los cuales rodean la corteza.

II La región interior o "blanca", compuesto por la placenta parietal (sin incluir las semillas), con menor contenido de clorofila y aspecto blanquecino (Havkin-Frenkel, et al., 2004). En la Figura 4 se muestra un corte transversal ilustrando las principales zonas de la vaina.

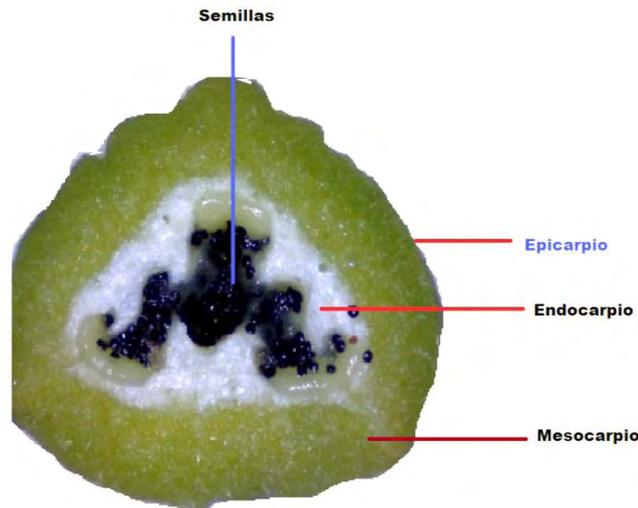


Figura 4. Corte transversal de vaina de vainilla verde.

La vaina verde contiene compuestos glucósidos precursores de aroma, el principal es glucovainillina y en menor cantidad glucósidos de p-hidroxibenzaldehído, ácido vainillinico y p-hidroxibencilalcohol, los cuales, por acción de la  $\beta$ -glucosidasa son hidrolizados, liberando compuestos aromáticos responsables del aroma de la vainilla, (Odoux, 2003; Pacheco, 2009). A nivel celular, existe una diferencia en la localización de la enzima y los sustratos. La  $\beta$ -glucosidasa está localizada en el citoplasma, mientras que la glucovainillina está localizada en las vacuolas. Es por esto que existe la necesidad de realizar una ruptura celular y así generar la interacción enzima-sustrato, a este proceso se le denomina curado o beneficio (Odoux, 2003).

En las vainas de vainilla la localización de glucovainillina y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa no es homogénea, en la Figura 5 se observa un corte transversal de

una vaina que fue dividida en regiones y en las que se midió la actividad de la enzima y la concentración de glucovanillina. Odoux (2003) encontró que la mayor actividad se encuentra en la región 4, el endocarpio, que coincide con la región que contiene la máxima concentración de glucovanillina.

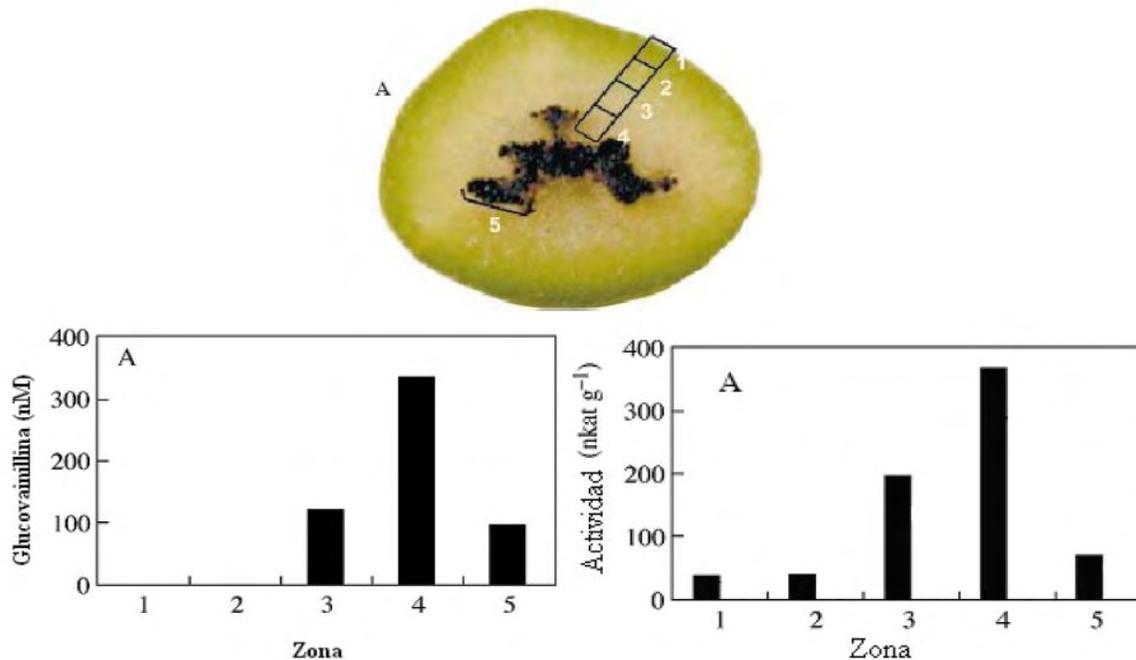


Figura 5. Actividad de  $\beta$ -glucosidasa por regiones en la vaina de vainilla (Odoux, 2003).

### Proceso de curado

El propósito del proceso de curado es crear condiciones que permitan la interacción sustrato-enzima y por lo tanto, el inicio de la formación de vainillina y otros componentes de sabor y olor catalizada por enzimas, así como la aparición de reacciones oxidativas enzimáticas y no enzimáticas. Un objetivo adicional es el secado de las vainas, como método de conservación para la inhibición del crecimiento de los microorganismos (Chaim et al., 2011).

El curado de vainas de vainilla es un proceso que implica el sudado y secado de las vainas hasta que pierden el 80% de su humedad inicial. Se compone de cuatro etapas: marchitado, sudado, secado y acondicionamiento (Krushnamurthy, 2013).

### **Marchitado**

El objetivo fundamental de esta etapa es detener el desarrollo vegetativo posterior a la cosecha, de tal manera que las enzimas previamente segregadas y sus sustratos correspondientes empiecen a interactuar. Los métodos de marchitamiento son dirigidos a incitar la ruptura celular, provocando la muerte fisiológica, se basan en el método tradicional mexicano que consiste en el marchitamiento de las vainas por la exposición al sol hasta que hay un cambio de tonalidad de verde a marrón, manifestación de la muerte del tejido (Krushnamurthy, 2013).

Los métodos de marchitado usados actualmente son:

- Exposición al sol: las vainas verdes son puestas sobre una tela negra, expuestas directamente al sol por varios días, hasta que las vainas se vuelven cafés.
- Marchitado en horno: las vainas son atadas en manojos, cubiertas por mantas e introducidas en hornos a 60°C durante 36 a 48 horas.
- Inmersión en agua caliente: las vainas se colocan en canastas y se sumergen en agua caliente (60 – 70°C) durante varios minutos.
- Marchitado por congelación: las vainas pueden ser sumergidas en nitrógeno líquido o colocadas por unas horas en un congelador (0 a -80°C); es preferible una congelación rápida para asegurar la viabilidad de las enzimas al iniciar el proceso de curado.

Todos los métodos cumplen con el objetivo de romper el tejido celular propiciando el contacto entre enzimas y sustratos, sin embargo, dependiendo del método de marchitado existen variaciones en el perfil de sabor de las vainas curadas. Condiciones severas de marchitamiento, como calor excesivo o prolongado, pueden

dar lugar a una completa destrucción de enzimas y, posteriormente, la detención de la actividad enzimática necesaria para catalizar la formación de compuestos aromáticos responsables del aroma y sabor. El marchitamiento rápido por calor o congelación es más beneficioso para la calidad de las vainas debido a que en estos métodos se minimizan los efectos adversos sobre la viabilidad de las enzimas en las posteriores etapas del proceso del curado (Ranadive 1983; Dignum 2001, 2002).

### **Sudado**

Durante esta etapa se exponen las vainas a elevados niveles de humedad y a una temperatura de 40°C entre 7 y 10 días. La finalidad es retener en las vainas la humedad suficiente para que actúen las enzimas que catalizan los procesos oxidativos e hidrolíticos que tienen lugar durante el beneficio (Havkin-Frenkel y Frenkel, 2006).

La vainillina y otros compuestos relacionados son liberados a partir de sus precursores glucosídicos y la oxidación de los compuestos fenólicos proporciona a las vainas su característica tonalidad oscura, así como otros atributos de sabor deseables (Ramachandra y Ravishankar, 2000); teniendo cuidados en no permitir el desarrollo de microorganismos. Al final de esta etapa, las vainas han alcanzado un color marrón y han desarrollado el sabor y aroma característicos. Sin embargo las vainas contienen aproximadamente 70% de humedad, y por lo tanto son susceptibles al deterioro por microorganismos.

### **Secado**

Durante esta etapa, las vainas son sometidas al sol y/o corrientes de aire, favoreciendo la pérdida de agua hasta alcanzar un nivel de humedad de 25 a 30% con el objetivo de detener algunos cambios bioquímicos y actividades enzimáticas indeseables, así como la contaminación por microorganismos (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

## Acondicionamiento

La última etapa del beneficio de la vainilla es el acondicionamiento; en este período las vainas se almacenan en cajas cerradas durante 1 a 6 meses o hasta su comercialización. Se registran algunas reacciones químicas y bioquímicas como la esterificación, degradación oxidativa y producción de algunos compuestos aromáticos (Ramachandra y Ravishankar, 2000). Aunque las prácticas varían de un país a otro, en general las vainas beneficiadas se colocan en cajas y se cubren con papel encerado (Havkin-Frenkel y Frenkel, 2006).

## Cinética enzimática

Las enzimas son proteínas formadas por una o más cadenas polipeptídicas que actúan como catalizadores mediante la reducción de energía libre de activación de las reacciones químicas. Como se muestra en la Figura 6, las enzimas aceleran las reacciones, ya que proporcionan nuevas vías de catálisis en las que el estado de transición tiene menor energía libre y por lo tanto se forma más fácilmente el producto que en las reacciones no catalizadas (Lehninger, (2006)).

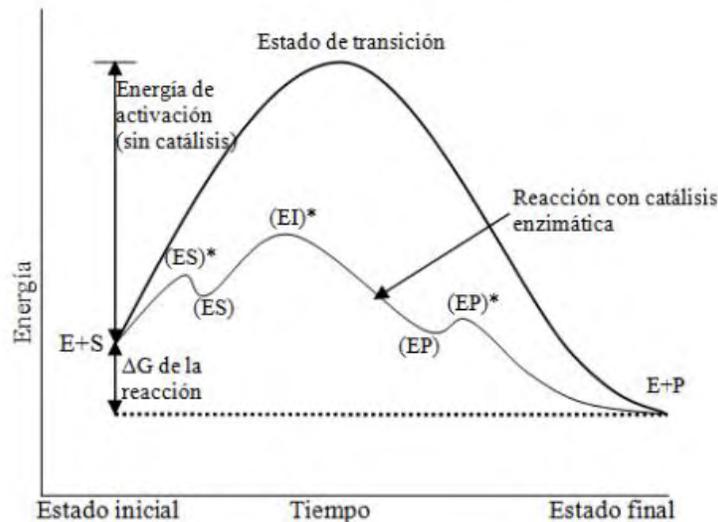


Figura 6. Niveles de energía en reacciones catalizadas por enzimas vs reacciones no catalizadas (Lehninger, et al., 2006).

La primera etapa en la catálisis es la formación de un complejo enzima-sustrato. Los sustratos se unen a las enzimas en la cavidad del centro activo. La especificidad de las interacciones enzima-sustrato proviene fundamentalmente de los puentes de hidrógeno formados y de la configuración del centro activo, que rechaza las moléculas que no presentan una forma suficientemente complementaria. El reconocimiento de los sustratos por las enzimas va acompañado de cambios conformacionales en los centros activos que facilitan la formación del estado de transición.

### **Efectos de la temperatura y del pH**

#### La temperatura

Cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación. Por debajo y por encima de esta temperatura, la enzima ralentiza la velocidad de la reacción enzimática. Se observa que muchas de las enzimas duplican la velocidad de una reacción enzimática cuando se aumenta la temperatura de unos 10° C aproximadamente y luego cae muy rápidamente por encima de los 40° C. El aumento en la velocidad de reacción se produce porque con temperaturas más altas existen más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar y aumentan el número de colisiones efectivas entre en sitio activo de la enzima y el sustrato; la disminución de la velocidad de la reacción es debida a la desnaturalización de la enzima (la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de 60 - 70°C).

#### El pH

La actividad enzimática también viene regulada por el pH de la solución del medio de la reacción enzimática. El pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y cuando varía, la conformación de la enzima se altera, produciéndose un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo y que puede llegar a no ser funcional. Esto es debido a que la conformación de una proteína depende

también de las atracciones y repulsiones entre los aminoácidos cargados negativamente y los cargados positivamente. Además, algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima (Lehninger, 2006).

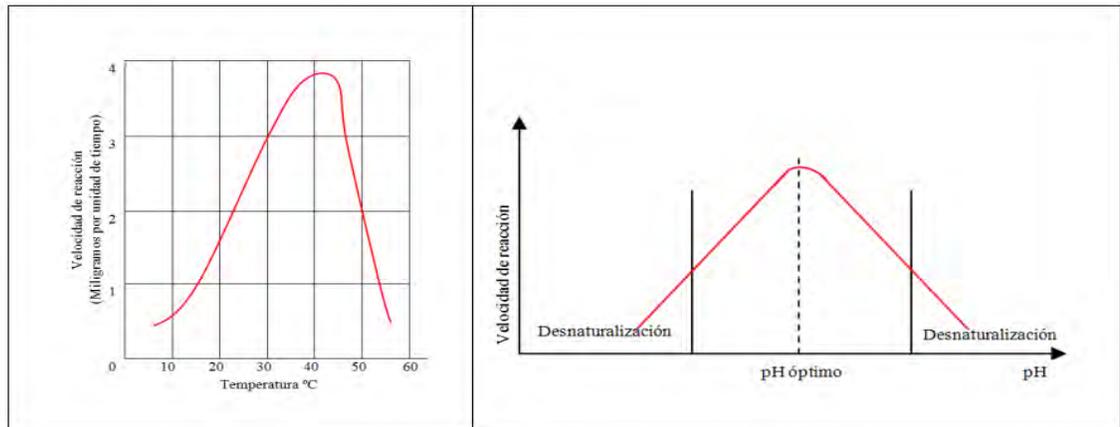
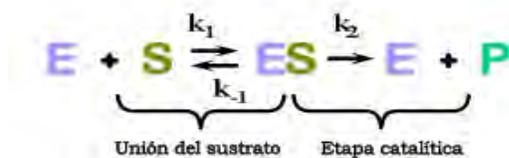


Figura 7. a) Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática. b) Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática (Aldabe, et al., 1998).

### Modelo de Michaelis-Menten

El modelo Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchas enzimas. En este modelo, una enzima (E) se combina con un sustrato (S) para producir un complejo enzima-sustrato (ES), que puede proseguir hasta formar un producto (P) o disociarse en E y S, tal como se indica en la Ecuación 1.



..... Ecuación 1

La velocidad de una reacción catalizada (V) nos indica la cantidad de sustrato consumido o producto formado por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional se designa por U.E. (unidad de actividad enzimática) y corresponde a los  $\mu\text{moles}$

de sustrato consumidos en 1 min, o bien a los  $\mu$ moles de producto formado en 1 min.

La velocidad de formación de producto,  $V_0$ , viene dada por la Ecuación 2, denominada Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots Ecuación 2$$

Donde  $V_{\max}$  es la velocidad cuando la enzima está completamente saturada de sustrato y  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten, que es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima (Stryer, 2003).

Los términos  $V_{\max}$  (velocidad máxima) y  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) son dos parámetros cinéticos característicos de cada enzima que pueden determinarse experimentalmente.

La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima y es característica de cada enzima. Cuando la concentración de la enzima es constante, la velocidad aumenta hasta alcanzar un máximo ( $V_{\max}$ ) y si la concentración del sustrato se incrementa, todas las moléculas de enzima están ocupadas por moléculas de sustrato, por lo que la velocidad no puede aumentar.

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) nos indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es característico de cada enzima según el sustrato utilizado (si la enzima tiene varios). También indica la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es la constante. Cuanto menor sea la  $K_m$  menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad del enzima hacia ese sustrato.

La representación gráfica de la velocidad de reacción ( $V_0$ ) en función de la concentración de sustrato ( $[S]$ ), se muestra en la Figura 8. Se observa que la velocidad máxima se alcanza de forma aproximadamente asintótica, por lo que es imposible obtener un valor definitivo mediante la representación típica de Michaelis-Menten.

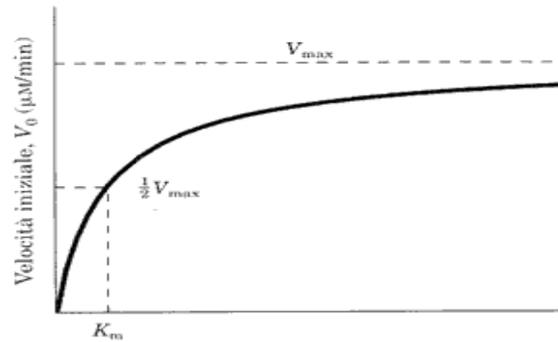


Figura 8. Representación gráfica del modelo Michaelis-Menten (Lehninger, et al., 2016).

Sin embargo, la  $V_{\text{max}}$  se puede determinar con exactitud si la ecuación se transforma en otra que proporcione una línea recta. Una representación del inverso de la velocidad ( $1/V_0$ ) frente al inverso de la concentración del sustrato ( $1/[S]$ ) genera una gráfica denominada Lineweaver-Burk o representación del doble recíproco, la cual se muestra en la Figura 9. La línea recta generada permite calcular la  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  ya que tiene una intersección de  $1/V_{\text{max}}$  y una pendiente de  $K_m/V_{\text{max}}$ .

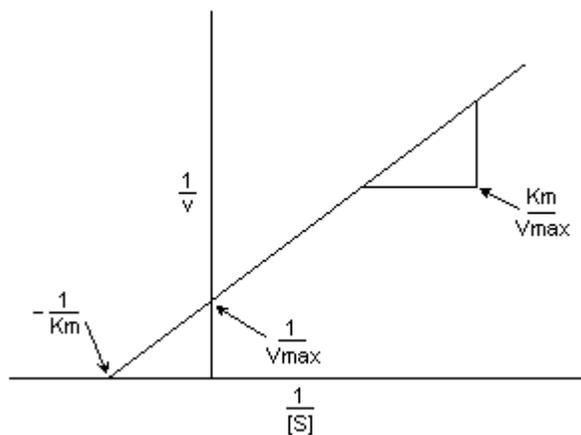


Figura 9. Representación del doble recíproco o Lineweaver-Burk (Lehninger, et al., 2016).

La actividad enzimática viene limitada por diferentes factores como puede ser la concentración de enzimas, de sustrato y la disponibilidad de cofactores.

### **$\beta$ -Glucosidasa**

Las glucosidasas pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de diferentes glúcidos. La actividad de  $\beta$ -glucosidasa es la que predomina dentro de este grupo de enzimas catalizando la hidrólisis de los  $\beta$ -D-glucopiranosídeos y en la hidrólisis de la celobiosa. Odoux (2003) purificó una  $\beta$ -glucosidasa a partir de vainas de *V. planifolia* y obtuvo un tetrámero 201 kDa con cuatro subunidades idénticas de 50 kDa. Su estructura se muestra en la Figura 10. No requiera de un activador, sin embargo es inhibida por la gluconolactona, fuconolactona, castanospermina, 1-detoxinojirimicina, eritol, pioles, etc. (Hernández, F. 2016).



Figura 10. Estructura tridimensional de  $\beta$ -glucosidasa (Barrett T, 1995)

Esta enzima ha sido objeto de muchos estudios debido a su importancia en numerosos procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo mediante la liberación de las fitohormonas y la degradación de la pared celular en el endospermo durante la germinación (Leah, et al., 1995), en procesos biotecnológicos como desintoxicación de los alimentos (Birk y col., 1996), conversión de biomasa (Pemberton, et al., 1980; Woodward y Wiseman, 1982) y en el realce del sabor en las bebidas (Günata, y col., 1993).

En la vainilla, la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza el enlace de glucovainillina liberando glucosa y vainillina. En la Figura 11 se ilustra la reacción de la glucovainillina catalizada por  $\beta$ -glucosidasa.



Figura 11. Reacción de hidrólisis de glucovainillina catalizada por  $\beta$ -glucosidasa.

La catálisis de las enzimas glicósido-hidrolasas involucra una reacción de doble desplazamiento, requiriendo un donador de protón y un nucleófilo. El sitio activo de las enzimas glicósido-hidrolasas tienen forma de bolsillo, ya que contienen grupos cargados, aromáticos y polares, el sitio activo de  $\beta$ -glucosidasa se muestra en la Figura 12. En el sitio activo se encuentra el péptido Ile-The-Glu-Asn-Gly (isoleucina, teonina-ácido glutámico-asparagina-glicina), donde Glu<sup>397</sup> con su grupo carbonilo ionizado actúa como nucleófilo, en otro péptido de la enzima se encuentra el Glu<sup>183</sup> que actúa como donador de protón (Figura 13).

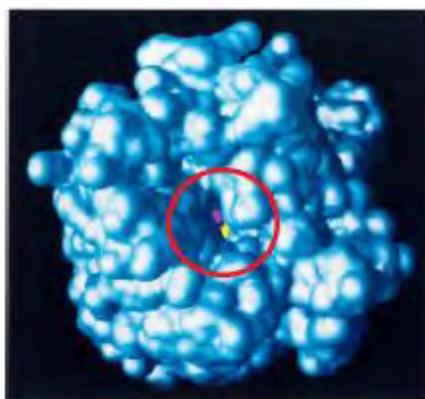


Figura 12. Sitio catalítico de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (la zona marcada con morado representa al Glu<sup>397</sup> (nucleófilo) y la de color amarillo es el Glu<sup>183</sup> (donador de protón) (Barrett T, 1995).

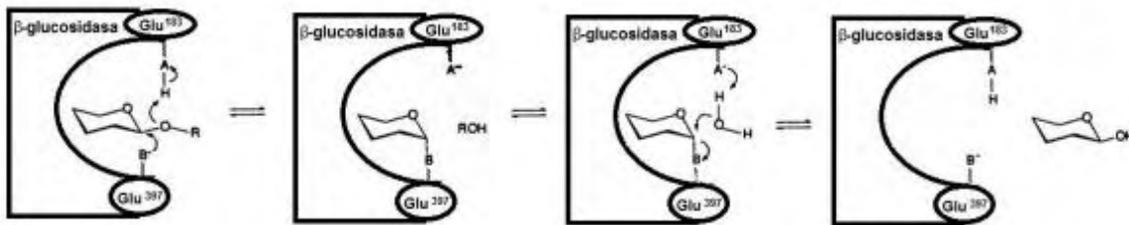


Figura 13. Mecanismo de hidrólisis de enlace  $\beta$ -glucosídico con retención de la glucosa: el oxígeno del enlace glucosídico es protonado por el grupo carboxilo, por otra parte el grupo carboxilo actúa como un nucleófilo sobre el enlace  $\beta$ -glucosídico, así se forma un intermediario enzima-sustrato y se libera un alcohol, posteriormente se hidroliza utilizando una molecular de agua liberándose de una molécula de carbohidrato. (Davies G, 1995).

Durante el proceso de curado la enzima no actúa en condiciones óptimas de temperatura y pH. Además, a medida que transcurre el tiempo del proceso de curado, la cantidad de agua en la vaina decrece y la formación de productos (glucosa y vainillina) disminuye la actividad de la enzima (Quintero, 2014).

### Principio de la reacción enzimática

La medición de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa está basada en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP), liberado por acción catalítica de la enzima  $\beta$ -glucosidasa sobre un sustrato artificial, el 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (4NPG), cuya estructura se muestra en la Figura 14.

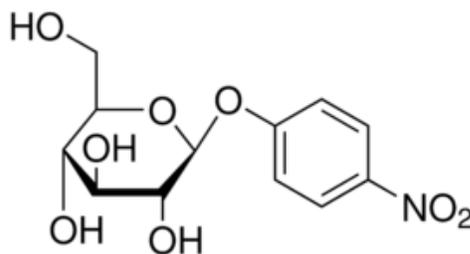


Figura 14. Estructura química del 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido.

El p-nitrofenol es un compuesto con propiedades ácido base que se puede utilizar como indicador, ya que la zona de viraje se encuentra en la escala de pH entre 5.6

y 7.6. Por debajo del punto de viraje es incoloro y a pH alcalino muestra un color amarillo el cual permite su cuantificación a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 400 nm (Quintero, 2014).

### **Proteasas**

Otras enzimas de gran importancia en las vainas de vainilla son las proteasas, que son responsables del rompimiento de los enlaces peptídicos entre cadenas de aminoácidos que componen las proteínas. Una función de las proteasas vegetales es descomponer las proteínas dañadas con el propósito de "reciclar" los aminoácidos y destinarlos para otros usos con lo que ayudan a regular el desarrollo y crecimiento de las plantas.

El marchitado y las etapas posteriores del proceso de curado se asocian con la actividad proteolítica en la vaina de vainilla. Esta conclusión se infiere de los cambios en el contenido de proteína de la vaina, que muestra una disminución en la cantidad de proteína en las primeras 24 horas posteriores al marchitado, pero un nivel constante de contenido de proteína en los días subsecuentes del proceso de curado.

Wild-Altamirano (1969) demostró que la actividad de las proteasas permanece constante cuando las vainas se encuentran maduras. Después del marchitamiento, la actividad de proteasas en las vainas se reduce en 2 días a alrededor de 60 a 70% del nivel previo a la madanza inicial.

Las proteasas son resistentes a las condiciones a las que las vainas son sometidas durante la etapa del marchitamiento y es probable que la actividad proteolítica latente sea desencadenada por la desnaturalización de proteínas debido al daño que sufren otras proteínas en el proceso de marchitamiento. Después de unas horas de iniciado el proceso de curado por la acción de proteasas, el nivel de enzimas y proteínas disminuye (Okamoto 2006; Muentz 2007).

### **III. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas de vainilla durante el proceso de curado evaluando los factores que modifican la reacción catalizada por la enzima.

#### **Objetivos particulares**

Desarrollar un proceso para obtener extractos de vainas de vainilla que permitan evaluar la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en vainas verdes y durante el proceso de curado.

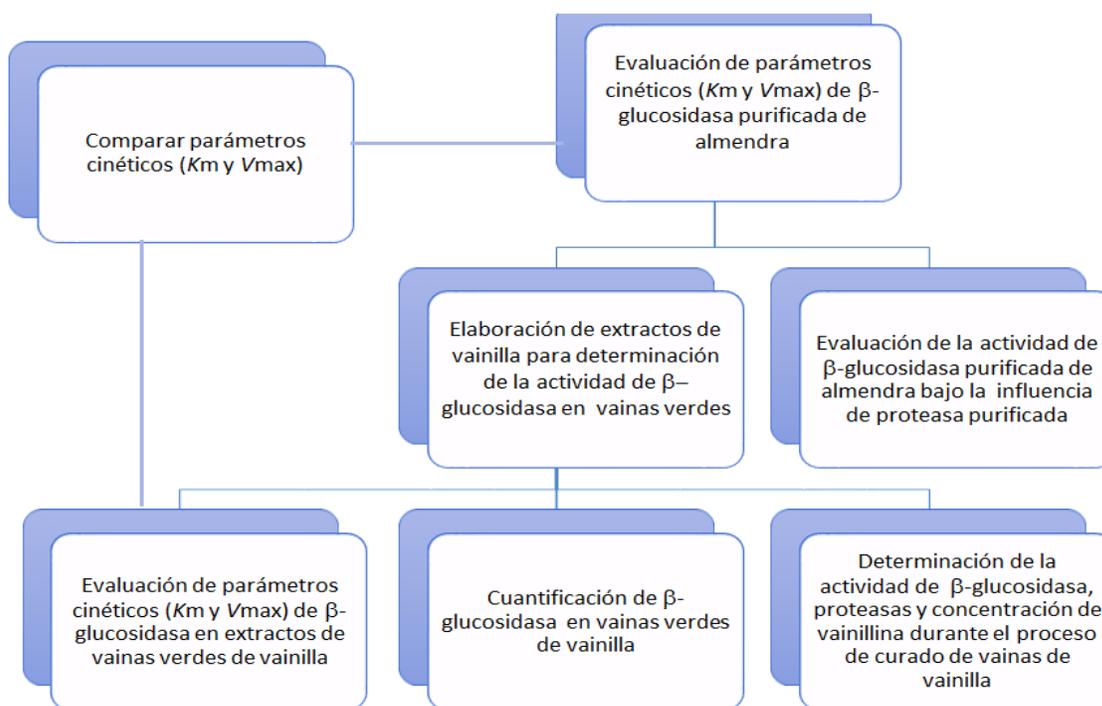
Cuantificar la enzima  $\beta$ -glucosidasa presente en las vainas verdes de vainilla.

Cuantificar la cantidad de vainillina durante el proceso de curado.

Obtener y comparar los valores cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) Siguiendo el Modelo de Michaelis-Menten de la  $\beta$ -glucosidasa en los extractos de vainilla y  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras.

Evaluar la influencia de proteasas sobre la actividad de  $\beta$ -glucosidasa comercial purificada de almendras.

## IV. Metodología



### IV.1 Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos usados durante la investigación fueron grado analítico.

Para evaluar la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa se utilizó como sustrato 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (4NPG),  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras como polvo liofilizado (2.1 unidades de enzima/mg sólido G0395-2.5KU) y p-nitrofenol provenientes de Sigma-Aldrich.

Para obtener los extractos de vainillina se utilizó una disolución de etanol al 50% a partir de etanol absoluto (marca Barker).

Para la determinación de vainillina se preparó una disolución madre disolviendo 0.010 g de vainillina (marca Sigma Aldrich) en 5.0 mL de etanol absoluto y diluyendo con agua destilada hasta un aforo de 100 mL.

Para determinar la actividad de las proteasas se utilizó caseína como sustrato, la proteasa purificada de *Aspergillus oryzae*, la cual contiene endopeptidas y exopeptidasas, con  $\geq 500$  U/g, la que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de L-leucine-p-nitroanilida por minuto y ninhidrina (provenientes de Sigma Aldrich).

Para controlar el pH de las reacciones se prepararon disoluciones búfer a partir de acetato de sodio, ácido acético, fosfato de potasio monobásico, fosfato de sodio dibásico, cloruro de amonio y amoniaco.

## **IV.2 Equipo e instrumental**

Como sistema de detección se utilizó un Espectrofotómetro Cary 3 marca Varian con capacidad de lectura en el espectro UV-Visible de 200 a 800 nm.

Los extractos de vainilla para cuantificar vainillina se prepararon utilizando un horno de microondas de energía focalizada Maxidigest MX 350 de Prolabo con una potencia máxima de 300 W.

Para determinar la masa de todos los reactivos se utilizó una balanza analítica Explorer Ohaus con una precisión de 0.1 mg.

## **IV.3 Curva de calibración de p-nitrofenol**

La curva patrón de p-nitrofenol se construyó en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 150  $\mu\text{M}$ , ajustando el pH a 10 con NaOH 0.1 M y búfer amoniacal 0.1 M pH 10. La absorbancia se midió a través de una celda de cuarzo Hellma de capacidad de 3.5 mL a una longitud de onda de 400 nm. Se obtuvo el intervalo lineal y la ecuación de la recta.

#### **IV. 4 Evaluación de la cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa comercial de almendra purificada**

Se realizó una curva de actividad enzimática en la cual se mantuvo constante la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras,  $9.78 \cdot 10^{-3}$  U.E./mL (concentración de  $\beta$ -glucosidasa en vainas de vainilla) y gradualmente se aumentó la concentración de 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (4NPG) desde  $10 \mu\text{M}$  hasta  $1200 \mu\text{M}$ . Se utilizó la temperatura óptima,  $40^\circ\text{C}$ , estudiada por Quintero (2014) y se evaluaron 2 diferentes pH's: 4, que es el pH óptimo reportado por Quintero, y 6.2, que es el pH de las vainas.

La reacción se detuvo colocando los matraces en un baño de hielo y ajustando el pH a 10 utilizando hidróxido de sodio 0.5 M y búfer amoniacal 0.1 M, pH 10. Posteriormente, se midió la absorbancia a 400 nm y se determinó la concentración de p-nitrofenol.

Con los resultados de la curva enzimática y siguiendo el modelo de Michaelis-Menten, se calcularon los parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$  de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra.

#### **IV.5 Elaboración de extractos enzimáticos a partir de vainas verdes de vainilla.**

Las vainas de vainilla verde fueron recolectadas en su madurez fisiológica en Papantla, Veracruz. Se seleccionaron de acuerdo a criterios de calidad en tamaño uniforme, sin manchas ni fisuras. Fueron transportadas al laboratorio a condiciones ambientales y se almacenaron en congelación a  $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para la extracción de  $\beta$ -glucosidasa la vaina fue descongelada a temperatura ambiente y se colocó un gramo de la misma finamente picada con 10 mL de búfer 0.1 M, pH 4 o 7, de acuerdo al experimento a desarrollar, y se agitó a una velocidad

controlada durante 10, 20, 30, 40, 50 o 60 min. Transcurrido el tiempo se filtró el extracto con ayuda de un papel filtro de filtración lenta.

Así mismo, se realizaron extractos con vainas que fueron sometidas a un tratamiento térmico para detener el proceso vegetativo (igual que en el proceso de curado tradicional). El tratamiento térmico consistió en inmersión en agua a 80°C durante 5 min. Luego del tratamiento térmico se obtuvieron los extractos siguiendo el procedimiento indicado anteriormente.

Para evitar la disminución de la actividad enzimática, los extractos fueron elaborados el mismo día en que se evaluó la actividad de la enzima.

Para evaluar las mejores condiciones de extracción se midió la absorbancia del producto de reacción (p-nitrofenol) obtenido a partir de la reacción entre el 4-Nitrofenil-β-D-glucopiranosido añadido y la β-glucosidasa presente en el extracto. La metodología fue la siguiente: 4 mL de extracto fueron incubados a dos diferentes pH's: 4 y 7 durante 30 min a 40°C en presencia de 4NGP a una concentración de 232.3 μM. Trascurrido este tiempo se realizó un ajuste a pH 10 con NaOH 1 M y búfer amoniacal a pH 10. Se aforó a 10 mL y se midió la absorbancia a 400 nm.

#### **IV.6 Curva de calibración de β-glucosidasa de almendra purificada**

Para conocer las unidades de enzima existentes en los extractos de las vainas de vainilla se hizo una curva patrón utilizando β-glucosidasa purificada de almendras. Se trabajó a pH 4. La concentración de 4-Nitrofenil-β-D-glucopiranosido se mantuvo constante (260 μM) y gradualmente se aumentó la concentración de enzima purificada de almendras de  $7.6 \cdot 10^{-4}$  Unidades de enzima (UE) hasta  $4.56 \cdot 10^{-1}$  U E. El tiempo de reacción fue de 30 min y la temperatura fue de 40 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción disminuyendo la temperatura con un baño de hielo y con la adición de NaOH 0.5 M y búfer amoniacal hasta llegar a pH 10. Se determinó la absorbancia de las disoluciones a 400 nm.

#### **IV.7 Cuantificación de Unidades de Enzima de $\beta$ -glucosidasa en vainas verdes de vainilla**

En los extractos obtenidos se llevó a cabo la medición de la actividad siguiendo las mismas condiciones que en la elaboración de la curva de calibración de la enzima purificada de almendras en el punto IV.6: pH 4, [4NPG]= 260  $\mu$ M, tiempo de reacción 30 min y 40 °C. El análisis se realizó por triplicado. Se calcularon las unidades de enzima existente en el extracto y, por ende, en la vaina verde de vainilla.

#### **IV.8 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas verdes de vainilla**

Utilizando extractos de vainas verdes de vainilla se elaboraron curvas de cinética enzimática. La cantidad de extracto se mantuvo constante (4 mL) y el pH 4. La temperatura utilizada fue 40 °C y el tiempo de reacción de 30 min. La reacción se detuvo como se describe en el punto IV.4.

Con los datos obtenidos se elaboró la curva de Michaelis-Menten y la representación doble recíproca de la cual se calcularon los valores  $K_m$  y  $V_{max}$ .

#### **IV. 9 Curva de calibración de proteasa comercial purificada**

Para cuantificar las unidades de enzima proteasa en las vainas de vainilla verdes, se hizo una curva patrón utilizando proteasa purificada de *Aspergillus oryzae*. Esta proteasa es de origen fúngico, su acción catalítica es endopeptidasa, es decir que rompe enlaces en el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasa ya que separa aminoácidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas. La enzima es estable entre pH 6 y pH 9, la temperatura a la que actúa es de 45 °C a 55 °C, con una muy amplia especificidad en el sitio activo de la enzima (Guadix, 2000).

La actividad de las proteasas se determinó por medio de dos reacciones. En la primera reacción actúan las proteasas sobre la caseína liberando péptidos, los cuales en la segunda reacción, al estar en presencia de la ninhidrina forman un

complejo color azul que tiene su máximo de absorbancia en 570 nm. La reacción se ilustra en la Figura 15.

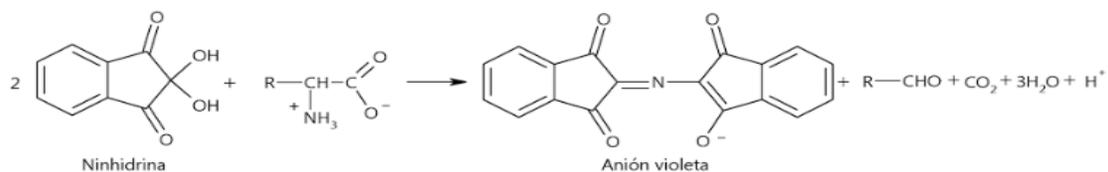


Figura 15. Reacción de ninhidrina con aminoácidos.

En la reacción de la caseína se trabajó a pH 7.8. La concentración de caseína se mantuvo constante (2.5 ppm) y gradualmente se aumentó la concentración de proteasas de 0.048 U. E. hasta 0.19 U. E. Se graficaron los resultados y se obtuvo la ecuación de la recta.

#### IV.9.1 Cuantificación de proteasas en vainas de vainilla

Los extractos para la cuantificación de las proteasas en las vainas de vainilla se obtuvieron con la molienda de 1 g de vaina en 10 mL de búfer de boratos 0.1 M pH 7.8; posteriormente se filtró el extracto a través de un papel filtro de filtración lenta.

Una vez obtenido el extracto se tomaron 3 mL y se adicionó 1 mL de una disolución de caseína de 2.5 ppm, se incubaron durante 30 min a 37 °C. Trascurrido el tiempo se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA), precipitando la caseína que no reaccionó. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de una disolución de ninhidrina 0.112 M y 1 mL de búfer de acetatos 4 M, pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 30 min a temperatura de ebullición. Trascurrido el tiempo se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 570 nm (Benítez, 2008). Este procedimiento se realizó por triplicado.

#### **IV. 10 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa comercial purificada bajo la influencia de una proteasa comercial purificada**

Una vez determinada la concentración de  $\beta$ -glucosidasa y de proteasas en las vainas de vainilla, se evaluó la interacción existente entre las enzimas.

Se realizaron pruebas a 3 diferentes pH's: 4 que es el óptimo de  $\beta$ -glucosidasa; 7.8, que es el óptimo de las proteasas; 6.2, que es el pH de las vainas verdes.

Se hizo una mezcla de ambas enzimas,  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras a una concentración de 0.00978 U.E./mL y proteasas purificadas de *Aspergillus orizae* a 0.05681 U.E./mL y se determinó la actividad de ambas enzimas. La concentración de 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido utilizado para estos análisis fue de 450  $\mu$ M.

#### **IV. 11 Evaluación de la actividad de las enzimas $\beta$ -glucosidasa y proteasas y concentración de vainillina durante el proceso de curado en las vainas de vainilla**

Para el proceso de curado se imitaron las condiciones a las que las vainas de vainilla son sometidas durante el proceso tradicional. El marchitado se realizó por inmersión en agua a 80 °C durante 15 min. La etapa de sudado se realizó envolviendo las vainas con parafilm para evitar la pérdida de humedad y almacenándolas en una estufa a una temperatura controlada de 40°C durante 13 días. A diferentes días durante el proceso de sudado se determinó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa, la actividad de las proteasas endógenas de la vaina y la concentración de vainillina.

De forma independiente, una vaina de vainilla, previa a la inmersión en agua a 80°C, fue sumergida en una solución búfer de acetatos pH 4 durante 15 min.

##### **IV.11.1 Actividad de $\beta$ -glucosidasa**

Para medir la actividad de  $\beta$ -glucosidasa se obtuvieron extractos a partir de lotes un gramo de vaina finamente picada que fueron suspendidos en 10 mL de búfer de

fosfatos pH 7. La suspensión se mantuvo en agitación controlada durante 40 min, transcurrido el tiempo se filtró el extracto a través de un papel filtro de filtración lenta. Una vez obtenido el extracto se ajustó el pH a 4 con ácido acético y se tomaron 4 mL del mismo. La reacción enzimática se llevó a cabo a pH 4 durante 30 min a 40°C utilizando una concentración de 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido de 450  $\mu$ M. Al concluir la reacción, se ajustó el pH a 10 con NaOH 1 M y búfer amoniacal 0.1 M, pH 10.

#### **IV.11.2 Actividad de proteasas**

Los extractos y la reacción para determinar la actividad de las proteasas en las vainas de vainilla se realizaron de acuerdo a lo establecido en el punto IV.9.1.

#### **IV.11.3 Concentración de vainillina**

Para cuantificar la vainillina se elaboraron extractos aplicando energía de microondas focalizadas por medio de un horno de microondas Maxidigest MX 350 de Prolabo con una potencia máxima de 300 W.

La configuración utilizada para llevar a cabo el método de extracción con microondas focalizadas consistió en un tubo externo (D= 4 cm) de vidrio conteniendo aproximadamente 25 mL de agua a temperatura ambiente. Dentro del tubo externo se colocó un tubo de vidrio de menor diámetro (3 cm), en el cual se colocaron 25 mL de una disolución etanol-agua al 50% y un gramo de vaina de vainilla picada finamente. Se adaptó un refrigerante al tubo interno con la finalidad de evitar pérdidas por evaporación de la disolución etanol-agua (Figura 16a). El arreglo anterior se colocó dentro del horno como se muestra en la Figura 16b (Longares, 2006).

Se programaron 5 ciclos de irradiación de un min al 50% de potencia y alternadamente 5 ciclos de 3 min de no-irradiación. Una vez terminado el proceso se tomó 1 mL de extracto y se vertió en un matraz de 100 mL. Se añadieron 2 mL

de NaOH 0.1M y se aforó hasta la marca con agua. Se midió la absorbancia a 348 nm.

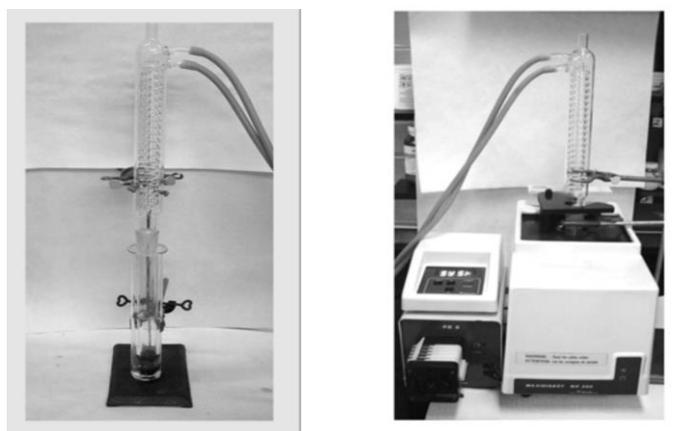


Figura 16. a) Arreglo primario para extracción con microondas focalizadas. b) Configuración final con microondas focalizadas.

## V Resultados y Discusión

### V. 1 Curva patrón de p-nitrofenol

En la Tabla 1 se muestra el intervalo lineal obtenido, así como las características de la curva patrón (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación) para p-nitrofenol y en la Figura 17 la representación gráfica de la curva de calibración, donde se puede observar que la absorbancia a 400 nm es proporcional a la cantidad de p-nitrofenol en un intervalo de 0.5 a 130  $\mu\text{M}$ . En la Figura 18 se muestra el gráfico de residuos de la misma curva.

Tabla 1. Parámetros de la curva de calibración de p-nitrofenol.

Compuesto	Límite inferior $\mu\text{M}$	Límite superior $\mu\text{M}$	$R^2$	Pendiente	Ordenada al origen
p-nitrofenol	0.5	132.99	0.9996	0.016	0.0043

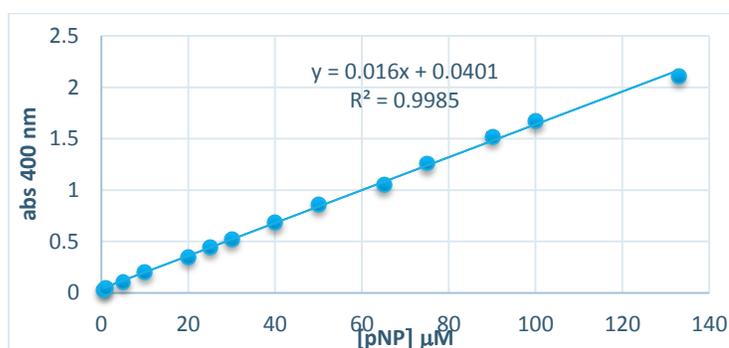


Figura 17. Curva patrón de p-nitrofenol.

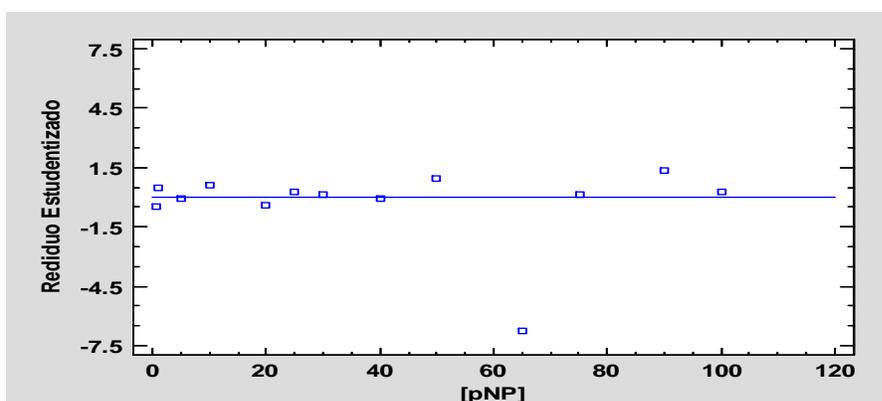


Figura 18. Gráfica de residuos estudentizados de curva de calibración de p-nitrofenol.

## V.2 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras

Las condiciones utilizadas para la determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras se muestran en la Tabla 2, mismas que se basaron en condiciones establecidas por Quintero (2014) en un trabajo previo.

Tabla 2. Condiciones de reacción para medir actividad de  $\beta$ -glucosidasa de almendra purificada.

Variable	Valor
pH de reacción	4 y 6.2
pH de lectura	10
Temperatura de reacción	40°C
Cantidad de enzima purificada de almendras	$9.78 \cdot 10^{-3}$ UE/mL
Tiempo de reacción	30 min
Concentración de sustrato	20.4 $\mu$ M - 1200 $\mu$ M

En la Figura 19 se observa que la actividad de la enzima tiene un comportamiento que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten a pH 4 y pH 6.2, en cuanto a la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción. La tendencia muestra que a mayores concentraciones de sustrato el aumento de la velocidad es menor, esto se debe a la saturación de la enzima, y en este punto, aunque aumente la concentración de sustrato la formación de producto es constante.

En la Figura 20 se hace una representación del inverso de la velocidad ( $1/V$ ) en función del inverso de la concentración del sustrato ( $1/[S]$ ), obteniéndose una línea recta, (gráfico Lineweaver-Burk). La intersección en el eje de las ordenadas de la recta resultante representa el inverso de la velocidad máxima ( $1/V_{max}$ ) y la pendiente de  $K_m/V_{max}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

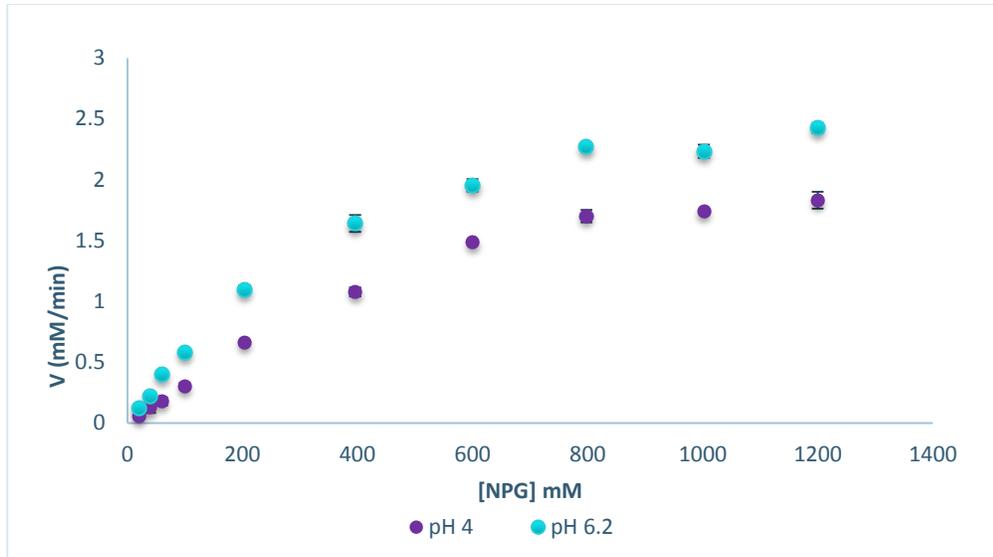


Figura 19. Cinética de Michaelis-Menten de la  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras a pH 4 y pH 6.2 (n=3).

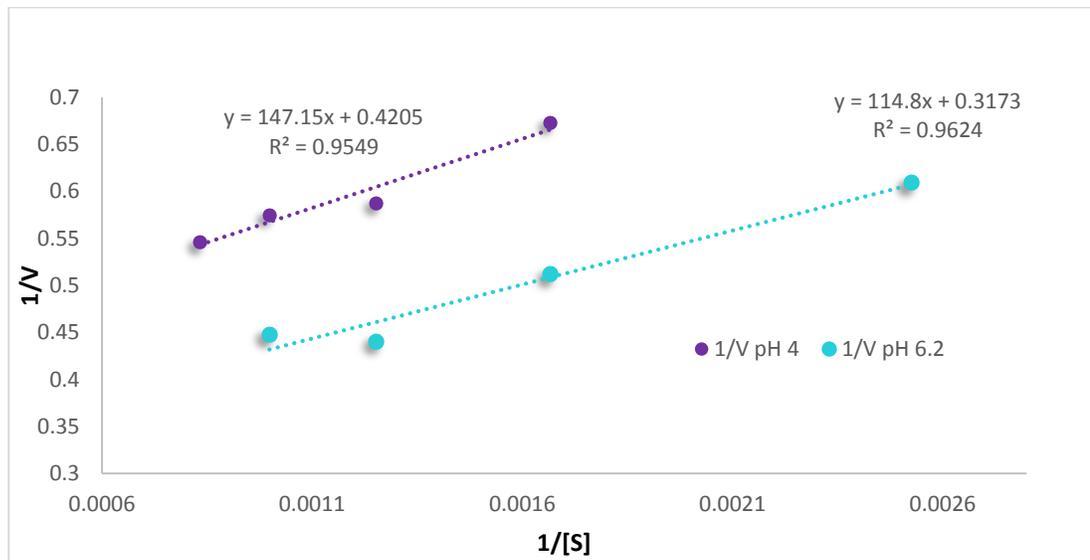


Figura 20. Gráfico Lineweaver-Burk de la  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra a pH 4 y pH 6.2

Tabla 3. Valores  $V_{max}$  y  $K_m$  para  $\beta$ -glucosidasa de purificada de almendras a pH 4 y pH 6.2.

<b><math>\beta</math>-glucosidasa purificada de almendras</b>		
pH	$V_{max}$	$K_m$
4	2.38 $\mu$ M/min	349.9 $\mu$ M
6.2	3.15 $\mu$ M/min	361.80 $\mu$ M

En la Figura 19 se observa que a pH 6.2 hay mayor producción de p-nitrofenol; sin embargo, al calcular los valores cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  a partir de las rectas mostradas en la Figura 30, el valor  $K_m$  de la enzima a pH 4 es menor, por lo tanto la enzima a este pH es más específica al sustrato a este pH.

### V. 3 Elaboración de extractos enzimáticos a partir de vainas de vainilla.

Durante la extracción de  $\beta$ -glucosidasa se mantuvieron constantes la masa de la vaina y el volumen de búfer. Para la evaluación de la reacción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa, el volumen del extracto, la concentración de 4 NPG, el tiempo de incubación y el pH de lectura tuvieron valores fijos. Los valores de los parámetros que se evaluaron se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones evaluadas para la elaboración de los extractos de vainilla.

Parámetro	Condición
Tiempo de extracción	10, 20, 30, 40, 50 y 60 min
Tratamiento térmico	Inmersión en agua 80 °C 5 min Sin tratamiento térmico
pH de extracción	4 y 7

En la Figura 21 se muestran los resultados, en la que se puede ver que la mayor respuesta se obtiene cuando la extracción se realiza a pH 4 con un tratamiento térmico y la menor a pH 7 sin tratamiento térmico previo a la extracción.

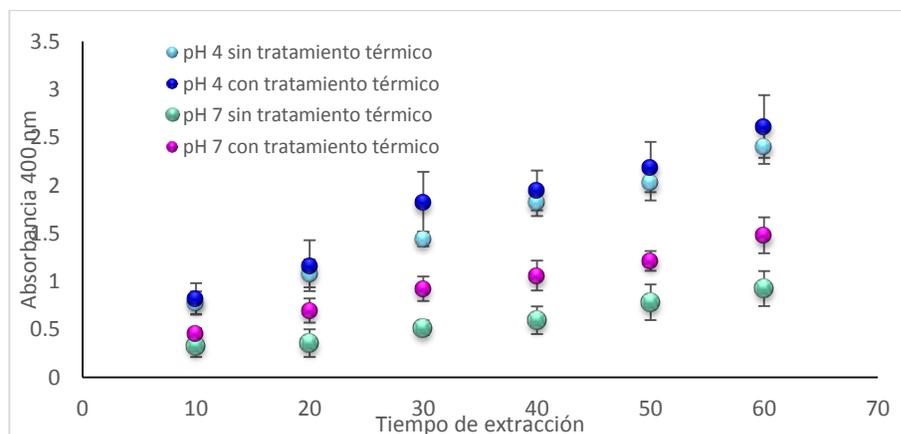


Figura 21. Evaluación de pH, tiempo de extracción y tratamiento térmico para la obtención de extractos de  $\beta$ -glucosidasa de vainas de vainilla verdes (n=3).

Con el fin de determinar la influencia de los parámetros de estudio sobre la extracción de la enzima se realizó el análisis de varianza (ANOVA) (Anexo A) de tres factores sin interacción, para ello se recurrió al programa Stargraphics Centurion XVI.I. Los resultados de la misma se muestran en la Tabla 5. Se observa que para los tres factores, P es menor a 0.05, es decir que los tres factores estudiados: pH, tiempo de extracción y el tratamiento térmico previo, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta, con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla 5. ANOVA para evaluar tiempo de extracción, pH y tratamiento térmico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F*</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo de extracción	11.6842	5	2.33685	35.86	0.0000
B:pH	10.8497	1	10.8497	166.51	0.0000
C:Tratamiento térmico	1.12134	1	1.12134	17.21	0.0001
RESIDUOS	4.17009	64	0.0651577		
TOTAL (CORREGIDO)	27.8254	71			

\*Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Adicional al análisis de varianza se realizó un procedimiento de comparación múltiple por el método de Turkey (Anexo A) para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes unas de otras. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. En la Tabla 6 se observa que se identificaron 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Tabla 6. Comparación de medias método: Tukey con 95.0% de nivel de confianza.

<i>Tiempo de extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	12	0.555997	0.0736872	X
20	12	0.807261	0.0736872	X X
30	12	1.11326	0.0736872	X X
40	12	1.31807	0.0736872	X
50	12	1.41076	0.0736872	X
60	12	1.78815	0.0736872	X

En la Tabla 7 se muestran las comparaciones posibles en 15 pares de tiempos de extracción, frente a 10 de ellos aparece un asterisco, el cual indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método que se empleó para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Con base en los resultados mostrados anteriormente, se decidió que la extracción de la enzima se llevara a cabo durante 40 min, ya que, aunque no existió diferencia significativa entre 30 y 40 min ni entre 20 y 30, sí la hubo entre 20 y 40 min. En el análisis de varianza mostrado en la Tabla 5, el Valor-P es menor a 0.05, lo que indica que existió diferencia significativa entre los extractos elaborados a partir de vainas que fueron sumergidas durante 5 min en agua a 80 °C y los obtenidos con vainas a las que no se les aplicó este tratamiento térmico; por lo que se estableció que las vainas, previamente a la extracción, serían sometidas al tratamiento térmico: inmersión en agua a 80°C durante 5 min.

Tabla 7. Comparación entre pares de tiempos de extracción.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
10 - 20		-0.251264	0.306147
10 - 30	*	-0.557267	0.306147
10 - 40	*	-0.762078	0.306147
10 - 50	*	-0.854764	0.306147
10 - 60	*	-1.23216	0.306147
20 - 30		-0.306003	0.306147
20 - 40	*	-0.510814	0.306147
20 - 50	*	-0.6035	0.306147
20 - 60	*	-0.980892	0.306147
30 - 40		-0.204811	0.306147
30 - 50		-0.297497	0.306147
30 - 60	*	-0.674889	0.306147
40 - 50		-0.0926861	0.306147
40 - 60	*	-0.470078	0.306147
50 - 60	*	-0.377392	0.306147

Por otro lado, aunque en la Figura 21, se puede ver que las mejores respuestas de la enzima se obtienen a un pH de extracción 4, no se puede asegurar que sean las condiciones óptimas para la extracción ya que de acuerdo a Quintero (2014), ese pH es el óptimo de la reacción catalizada por  $\beta$ -glucosidasa. Por lo tanto, para optimizar el pH de extracción de la enzima se hicieron pruebas a 2 diferentes pH's de extracción.

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 22. Se puede ver que la mejor respuesta se obtuvo cuando se realiza la extracción a pH 7 y se mide la actividad de  $\beta$ -glucosidasa a pH 4 y la menor cuando se trabaja a pH 7 durante la extracción como en la reacción.

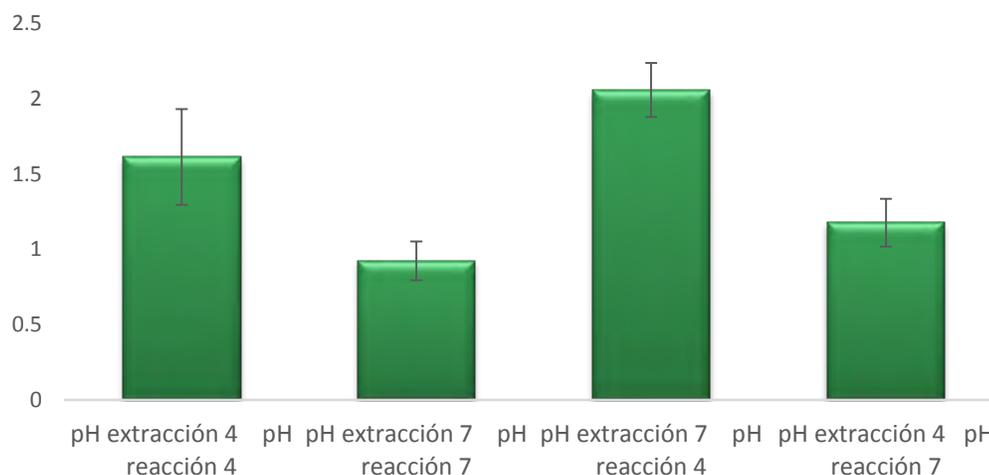


Figura 22. Evaluación del pH de extracción y pH de reacción para elaboración de extractos. Señales obtenidas para evaluar el pH de extracción de  $\beta$ -glucosidasa de las vainas de vainilla y pH para medir su actividad (n=3).

#### V. 4 Curva de calibración de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras

Para la cuantificación de la enzima en la vaina se realizó una curva de calibración usando un estándar de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras siguiendo las condiciones mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para elaboración de curva de calibración de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra.

Parámetro	Valor
pH de reacción	4
pH de lectura	10
Temperatura de reacción	40 °C
Concentración de sustrato	260 $\mu$ M
Unidades de enzima	$7.6 \cdot 10^{-4}$ a $4.56 \cdot 10^{-1}$
Tiempo de reacción	30 min

En la Figura 23 se muestra el comportamiento del aumento de la concentración de  $\beta$ -glucosidasa frente a una concentración de sustrato constante. A bajas concentraciones la enzima tiene el comportamiento lineal, sin embargo a medida que aumenta la concentración de la misma la gráfica se comporta como una hipérbola.

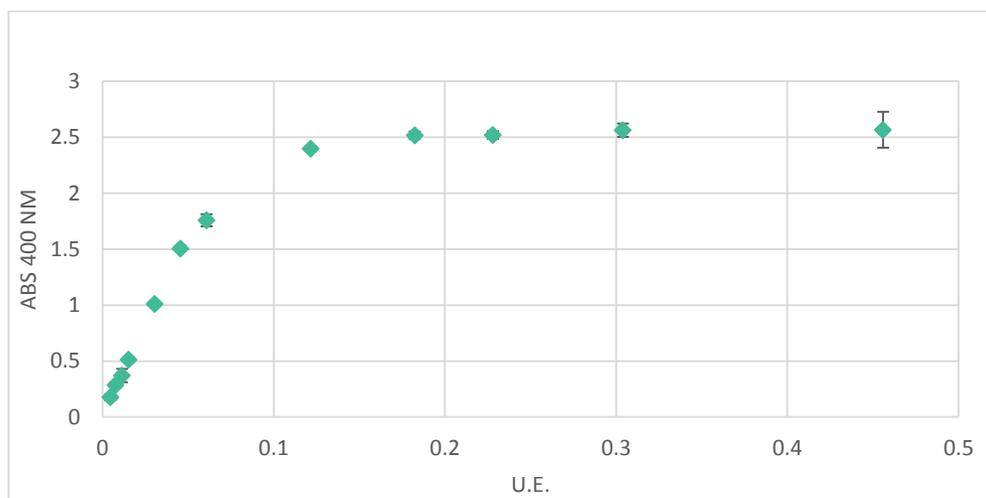


Figura 23. Comportamiento de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras a concentración de sustrato constante.

En la Figura 24 se observa únicamente el intervalo lineal, y las características de la recta obtenida.

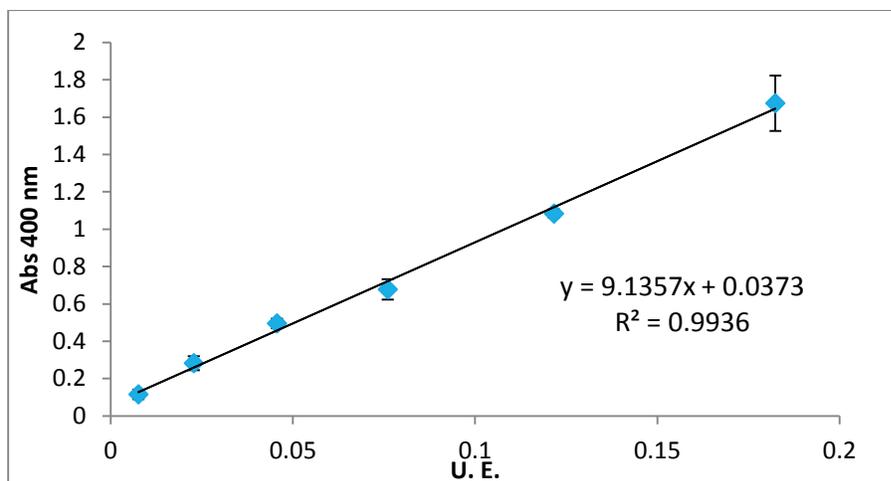


Figura 24. Representación del intervalo lineal de la curva de calibración de la enzima purificada de almendras. U.E. vs absorbancia

#### V. 4.1 Cuantificación de $\beta$ -glucosidasa en vainas de vainilla verdes.

Una vez obtenida la ecuación de la recta, se determinó por triplicado la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa presente en las vainas verdes de vainilla. En la Tabla 9 se muestran las condiciones utilizadas para las determinaciones realizadas y en la Tabla 10 los resultados obtenidos.

Tabla 9. Condiciones usadas para determinar U.E. de  $\beta$ -glucosidasa en vainas verdes.

Parámetro	Valor
Volumen de extracto	4 mL
pH de reacción	4
Temperatura de reacción	40 °C
Tiempo de reacción	30 min
Concentración de sustrato	260 $\mu$ M
Volumen de reacción	10 mL

Tabla 10. Concentración de enzima en vainas de vainilla verdes.

U. E. por gramo de vaina	$9.78 \cdot 10^{-2}$
Desviación estándar	$3.52 \cdot 10^{-3}$
C. V.	8.99 %

De acuerdo a lo visto en la Tabla 10, la  $\beta$ -glucosidasa localizada en 1 gramo de vaina podrá convertir 1  $\mu$ M de sustrato por minuto a las condiciones estudiadas.

### V.5 Curva de calibración de proteasa

Para la cuantificación de las proteasas presentes en la vaina se realizó una curva de calibración utilizando proteasas purificadas de *Aspergillus oryzae*. En la Figura 25 se muestra la representación gráfica del intervalo lineal, se observa que la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de proteasas en un intervalo de 0.05 a 0.18 U.E.

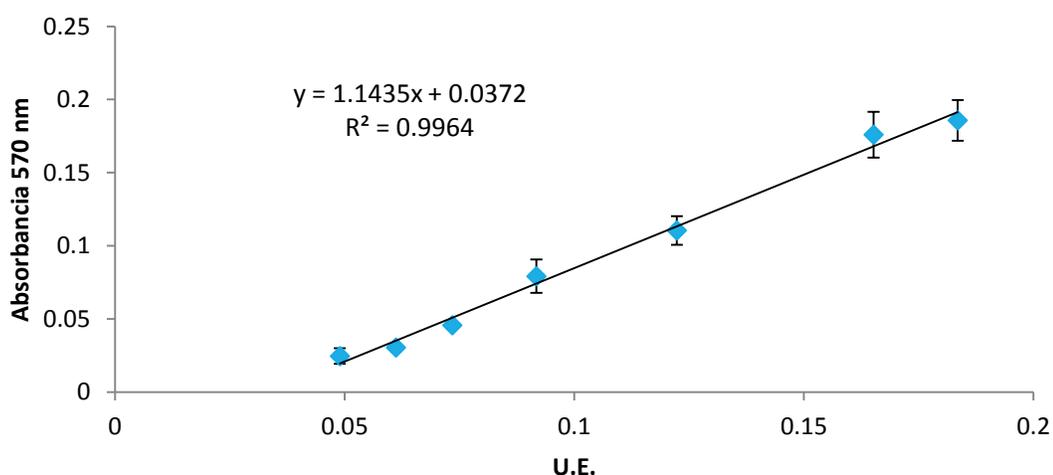


Figura 25. Curva de calibración de proteasa purificada de *Aspergillus oryzae*.

#### V.5.1 Cuantificación de proteasa en vainas verdes de vainilla

Una vez obtenido el patrón lineal de actividad de la enzima se elaboraron extractos y se determinó por triplicado la cantidad de proteasas presentes en vainas verdes de vainilla. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Concentración de proteasa en vainas de vainilla verdes.

<b>U. E. por gramo de vaina</b>	0.5681
<b>Desviación estándar</b>	0.0274
<b>C. V.</b>	4.83%

## V.6 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa purificada de almendra bajo la influencia de proteasa purificada de *Aspergillus oryzae*.

Ya conocidas las concentraciones de  $\beta$ -glucosidasa y de proteasas en las vainas de vainilla, se evaluó la interacción existente entre estas enzimas. Las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 12. Se realizaron pruebas a pH 4, que es el óptimo de  $\beta$ -glucosidasa; 7.8, que es el óptimo de las proteasas; 6.2, que es el pH de las vainas verdes.

Tabla 12. Condiciones para la determinación de la influencia de proteasas sobre  $\beta$ -glucosidasa

Parámetro	Valor
Concentración $\beta$ -glucosidasa	$9.78 \cdot 10^{-3}$ U.E./mL
Concentración proteasas	$5.68 \cdot 10^{-1}$ U.E./mL
Temperatura de reacción	40°C
Tiempo de reacción	30 minutos
Concentración de 4NPG	450 $\mu$ M
pH de reacción	4, 6.2 y 7.8

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26. Se observa que la mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa es a pH 6.2, sin embargo, es a este pH donde se encontró el mayor decremento de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa cuando se adicionan proteasas ya que disminuyó un 16.1%. A pH 4 la actividad de  $\beta$ -glucosidasa por influencia de las proteasas solo se afectó un 12.8%. Y por último, a pH 7.8 que es el óptimo de las proteasas, la disminución de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa fue de 8%.

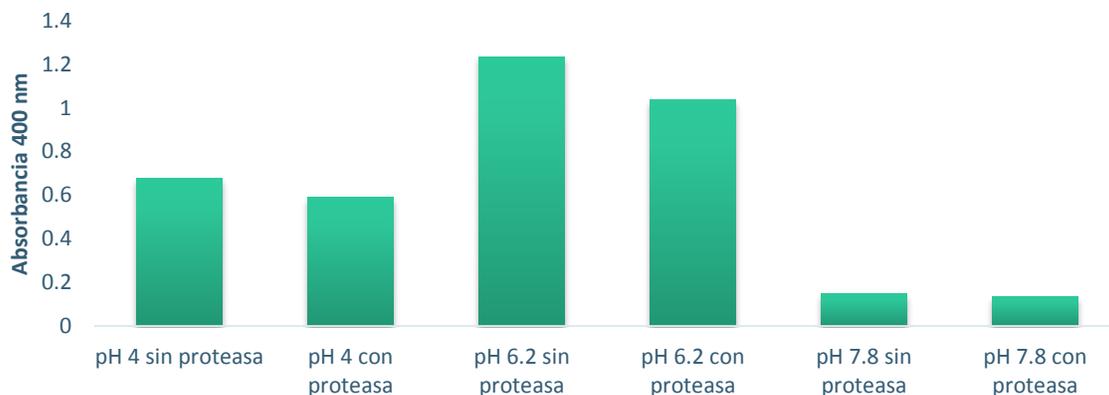


Figura 26. Influencia de la actividad de una proteasa purificada de *Aspergillus oryzae* sobre  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras.

Se determinó adicionalmente la actividad de la proteasa a pH 6.2 y a pH 7.8. No se pudo realizar la medición de la actividad a pH 4 debido a que el sustrato utilizado es caseína y el punto isoeléctrico de la misma es 5.6. Se observó que la actividad de las proteasas es 1.9 veces mayor a pH 7.8 que a pH 6.2.

### V.7 Cinética enzimática de $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas verdes de vainilla

Una vez establecidas las condiciones óptimas extracción de  $\beta$ -glucosidasa de vainas de vainilla verde, se midió la cinética enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa nativa de las vainas. Las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de reacción para determinar la cinética enzimática de  $\beta$ -glucosidasa en extractos de vainas de vainilla verdes.

Parámetro	Valor
pH de reacción	4
pH de lectura	10
Temperatura de reacción	40 °C
Tiempo de reacción	30 min
Concentración de 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido	75 $\mu$ M - 1200 $\mu$ M

Se eligió trabajar a pH 4 debido a que se observó que la enzima purificada de almendras fue más específica para 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido a este pH. Es decir que en la Figura 27 se muestra el comportamiento de β-glucosidasa procedente de las vainas de vainilla verde a pH 4 y 40 °C frente al aumento de concentración de sustrato. Se observa que sigue una cinética Michaeliana. Al graficar los inversos de la velocidad y de la concentración del sustrato se obtiene una línea recta, la cual se muestra en la Figura 28.

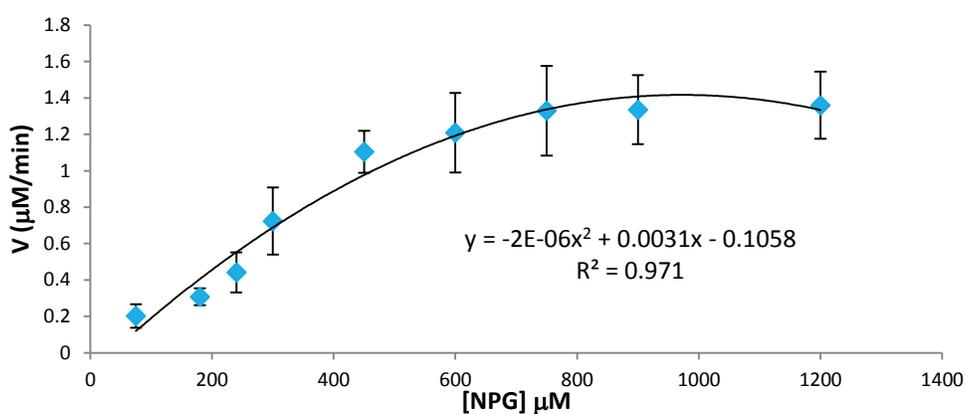


Figura 27. Modelo Michaelis-Menten para β-glucosidasa en extractos de vainilla verde a pH 4 y 40°C.

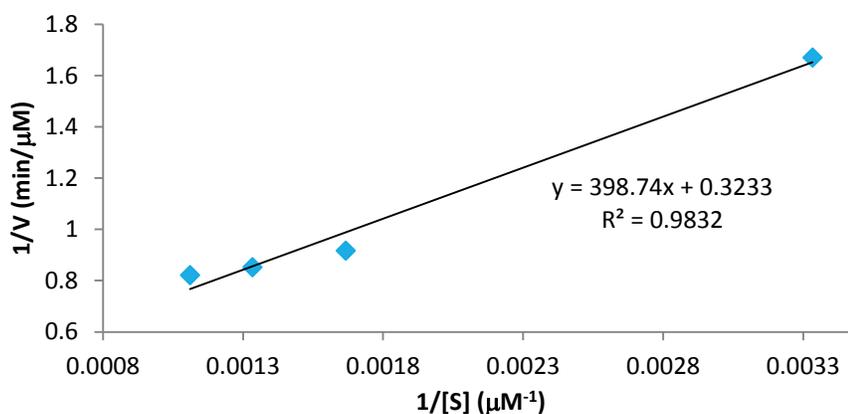


Figura 28. Gráfico Lineweaver Burk de β-glucosidasa de extractos de vainilla a pH 4.

A partir de la ecuación de la recta mostrada en la Figura 28 se obtienen los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , los cuales se muestran en la Tabla 14. En la misma Tabla se presentan los valores  $K_m$  y  $V_{max}$  obtenidos anteriormente para la enzima purificada de almendras a pH 4.

Tabla 12. Parámetros cinéticos para  $\beta$ -glucosidasa de vainilla y  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras a pH 4 y 40°C.

Enzima de vainilla		Enzima purificada de almendras	
$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
128.90 $\mu\text{M}$	3.09 $\mu\text{M}/\text{min}$	349.9 $\mu\text{M}$	2.38 $\mu\text{M}/\text{min}$

La determinación de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa purificada de almendras se realizó con la cantidad de enzima presente en las vainas verdes por lo que se pueden comparar los parámetros cinéticos. Se observa que el valor de  $K_m$  de la enzima nativa de las vainas de vainilla es menor que el valor de  $K_m$  de la enzima purificada de almendra, esto significa que la enzima nativa de las vainas presenta mayor afinidad al 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido. Las velocidades máximas representan un valor teórico de la velocidad cuando todos los centros activos de la enzima se encuentran ocupados, en este caso la enzima nativa de las vainas posee la mayor velocidad máxima.

## V.8 Evaluación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa, proteasas y concentración de vainillina durante el proceso de curado

Tres vainas de vainilla fueron sometidas a un proceso de curado en el laboratorio similar al curado tradicional; una vaina adicional se sometió al proceso de curado posterior a una inmersión durante 15 minutos en búfer pH 4.

### V.8.1 Actividad de $\beta$ -glucosidasa

Se evaluó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en extractos elaborados a partir de las vainas que sometieron al proceso de curado. Dichos extractos se elaboraron utilizando las condiciones óptimas de extracción encontradas en el punto V.3. La

evaluación de la actividad de la enzima se realizó a pH 4, 40 °C y utilizando una concentración de 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido de 450  $\mu$ M durante 30 min. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos durante el proceso de curado.

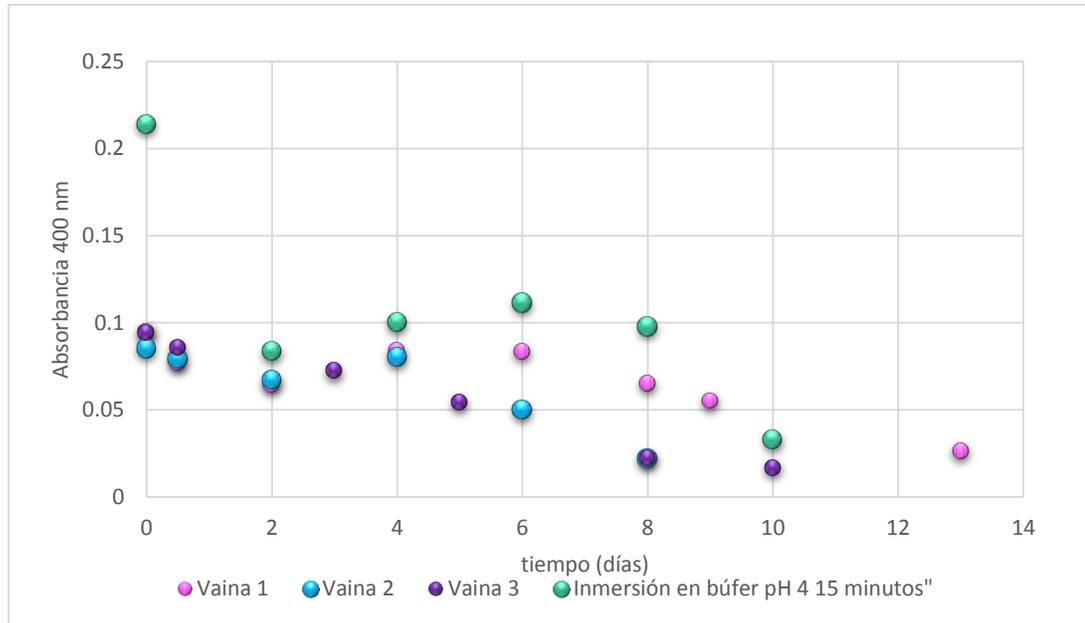


Figura 29. Evaluación de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa durante el proceso de curado

Se esperaba que la actividad máxima de  $\beta$ -glucosidasa fuera mayor cuando la vaina se encontraba verde (Dignum y col., 2002 y Odoux y col., 2006), sin embargo este comportamiento solo se observó en la vaina que fue sometida a una inmersión previa en búfer de acetatos. En la Figura 29 se observa que la actividad máxima de  $\beta$ -glucosidasa en las vainas que no fueron sometidas a la inmersión en búfer pH 4 se encontró entre los días 4 y 6 del proceso del curado, y posterior a este tiempo inició se un decremento de la actividad de la enzima.

Es importante señalar que la congelación de las vainas reduce la actividad de  $\beta$ -glucosidasa (Tapia, 2011). Dignum, et al. (2001) reportaron que después de un periodo de almacenamiento de 28 días a -20 o -80°C se produce un decremento en la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en un 93%; mientras que Odoux y col. (2006)

confirmaron que la congelación tiene un efecto muy perjudicial sobre la actividad enzimática, después del proceso de descongelación la actividad de la enzima disminuyó al 3% de la actividad inicial.

Otros factores que influyen en la disminución de la actividad de la enzima durante el proceso de curado son: la disminución de la actividad de agua, la presencia de proteasas que son enzimas que rompen enlaces peptídicos de la secuencia de aminoácidos de otras proteínas (incluida la  $\beta$ -Glucosidasa) y la inhibición por producto, en este caso vainillina y glucosa.

### V.8.2 Actividad de proteasas durante el proceso de curado

En la Figura 30 se muestra la actividad de las proteasas presentes en las vainas de vainilla durante el proceso de curado. Se puede observar que la actividad máxima de las proteasas se encontró entre los días 6 y 8 del proceso de curado. Sin embargo la actividad de las proteasas en la vaina que fue sometida a una inmersión en búfer pH 4 no presentó un aumento significativo en la actividad de las mismas, es decir, ocurrió una inhibición por ajuste de pH.

En la figura 29 se observa que la disminución de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa es más evidente a partir del día 6, lo cual coincide con el día de actividad máxima de las proteasa.

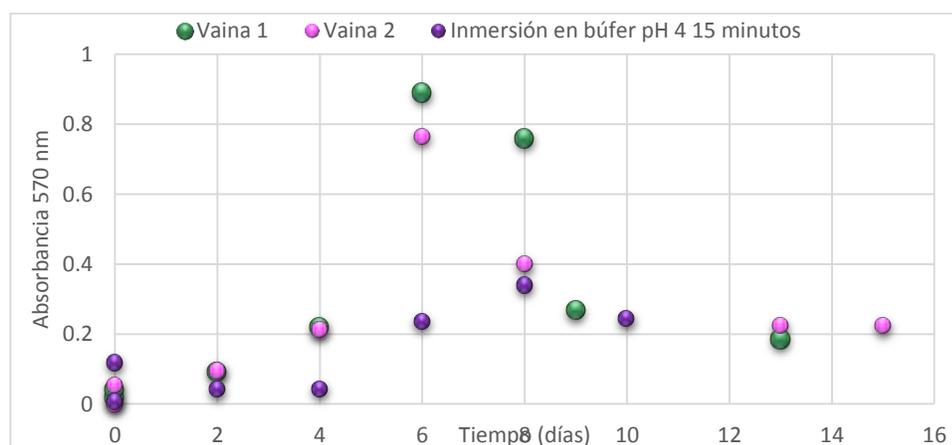


Figura 30. Actividad de proteasas durante el proceso de curado

### V.8.3 Concentración de vainillina durante el proceso de curado

Se elaboró un extracto a partir de las vainas sometidas al proceso de curado en los cuales se evaluó la variación en la concentración de vainillina durante el proceso. Se observa en la Figura 31 que en los primeros 4 días la formación de vainillina es mayor en la vaina que fue sometida a inmersión en búfer pH 4 durante 15 min, esto coincide con la mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa de la vaina sometida a inmersión. Sin embargo, después del día 6 no hay diferencia entre las vainas que no fueron sometidas a inmersión y llegan a una concentración similar.

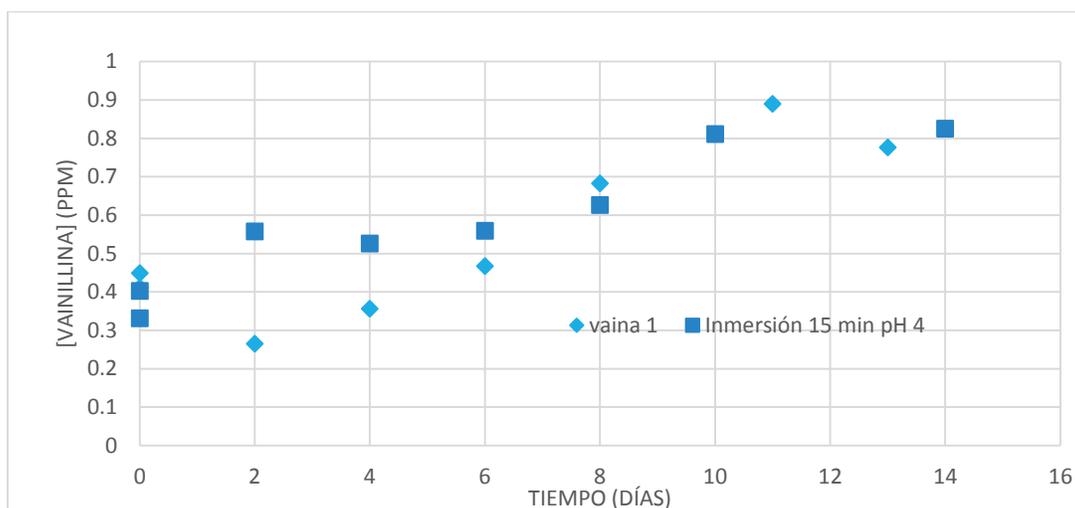


Figura 31. Concentración de vainillina durante el proceso de curado.

Ambas muestras el último punto mostraron un decremento en la concentración de vainillina, Rosado-Zarraba, et al. (2007) encontraron que este fenómeno también ocurre en un beneficio tradicional y se debe a varios factores como la permeabilidad de los empaques, las condiciones de la atmósfera, evaporación de agua y vainillina, entre otros. De igual manera, Viveros (2007) menciona que el decremento de la concentración de vainillina se debe a la pérdida de la humedad, por el almacenamiento en recipientes no herméticos; Pérez- Silva, et al. (2006) atribuyen este mismo fenómeno a la volatilidad de los alcoholes formados durante el proceso de curado.

## Conclusiones

- En el estudio realizado se obtuvo un extracto de vainas de vainilla a partir del cual y utilizando espectrofotometría UV-Vis se determinó la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa.
- La especificidad de la enzima nativa en las vainas de vainilla sin purificar por el 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glocopiranosido fue mayor a la de la enzima purificada de almendras comercial.
- Las condiciones de  $\beta$ -glucosidasa no son las óptimas durante el proceso de curado. El pH de la vaina es de 6.2 y el óptimo al que trabaja la enzima es de 4. Al someter a inmersión una vaina verde en un búfer pH 4 durante 15 min antes del iniciar el proceso de curado, se encontró que  $\beta$ -glucosidasa tuvo una mayor actividad, sin embargo, esto no se vio reflejado en un aumento significativo en la concentración de vainillina.
- Se encontró que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se ve más disminuida por la actividad de proteasas a pH 6.2 que a pH 4. Sin embargo, cuando la vaina fue sometida a inmersión en un búfer pH 4 durante 15 min antes del iniciar el proceso de curado, la actividad de proteasas disminuyó pero no se vio reflejado en un aumento en la actividad de  $\beta$ -glucosidasa y por lo tanto en un incremento en la concentración de vainillina.

## Bibliografía

Aldabe, J., Hueto, A., Juni, J. & López, P., Biología, Ed. Erein, 1998, p. 128

Barrett, T., Suresh, CG., Tolley SP., Dodson EJ. & Huges Ma. (1995) The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from withe cover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure*. 3, 951-960.

Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42, 227-236.

Chaim, A., Ranadive, S., Tochiuitl-Vázquez, J & Havkin-Frenkel, D. (2011). Curing of Vanilla. En Daphna Havkin-Frenkel & Faith C. Belanger (Ed.) *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 79- 103). Blackwell Publishing Ltd.

Cid-Pérez, T.S. & López-Malo, A. (2011). Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 5, 51-63.

Curti-Díaz, E. (1995) Cultivo y beneficiado de la vainilla en México. Folleto técnico para productores. Organización Nacional de Vainilleros Indígenas. Papantla, Veracruz.

Davies G, Herrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3. 853,859.

Dignum M.J.W., Kerler J. & Verpoorte R. (2001)  $\beta$ -Glucosidase and peroxidase stability in crude enzyme extracts from green beans of *Vanilla planifolia* Andrews. *Phytochemical Analysis* 12, 174–179.

Dignum MJW, Kerler J & Verpoorte R. (2002). Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry* 79, 165-171.

Evaluación del efecto de sonicación- microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), Isidro Pacheco Reyes. Instituto Politécnico Nacional. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional. Unidad Oaxaca. 2009

FAOSTAT. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA disponible en <http://faostat.fao.org/>, consultado 5 de octubre de 2015

Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P. & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars pharmaceutica* 41, 79-89.

Guarnizo, F. & Nel, P. (2009). Experimentos de Química Orgánica - Con enfoque en ciencias de la vida. Ediciones Elizcom.

Günata, Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1993). Role of the enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In P. Schreier y P. Winterhalter (Eds.), *Progress in flavour precursor studies*. Carol Stream IL: Allured Publishers 219–234.

Havkin-Frenkel, D. & Frenkel, C. (2006). Postharvest handling and storage of vanilla beans. *Stewart Postharvest Review* 4-6.

Havkin-Frenkel, D., French, J.C., Graft, N.M., Pak, F.E., Frenkel, C. & Joel, D.M. (2004) Interrelation of curing and botany in vanilla (*Vanilla planifolia*) bean. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 629, 93–102.

Hernández, F. Evaluación de la enzima beta-glucosidasa utilizando dispositivos lab-on-chip. 2016. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química. UNAM.

Krushnamurthy Anuradha, Bellur Nanjundaiah Shyamala & Madeneni Madhava Naidu, (2013). Vanilla- its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, 1250-1276.

Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., & Mundy, J. (1995). Biochemical and molecular characterization of a barley seed  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* 26, 15789– 15797.

Lehninger, A., Nelson, D & Cox, M. (2006). *Principios de Bioquímica* 4<sup>o</sup> Edición, Ed. Omega, Barcelona p. 191-196, 203.

Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1995). *Principios de Bioquímica*, 2<sup>o</sup> Edición, Ed.Omega, Barcelona.

Longares, A. Determinación Espectrofotométrica de Vainillina y p-Hidroxibenzaldehído a partir de extracción de *Vanilla fragans* utilizando microondas focalizadas. (2006) Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Longares-Patrón, A. & Cañizares-Macías, M.P. (2006). Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from *Vanilla fragans*. *Talanta* 69, 882-887.

Marquez, O. & Waliszewski, K.N. (2008). The effect of thermal treatment on  $\beta$ -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1993–1999.

Muentz, K. (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany* 58, 2391–2407.

Odoux E, Escoute Y & Verdeil, JL. (2006). The relation between glucovanillin,  $\beta$ -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence,

freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals Applied Biology* 149, 43-52.

Odoux E., Escoute J., verdeil J-L and Brilloulet M. (2003). Localization of  $\beta$ -glucosidase Activity and Glucovanillin in Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany* 92: 437-444.

Okamoto, T. (2006). Transport of proteases to the vacuole: ER export bypassing Golgi *Plant Cell Monographs* 4, 125–139.

Pemberton, M. S., Brown, R. D., & Emert, G. H. (1980). The role of  $\beta$ -glucosidase in the by conversion of cellulose to ethanol. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 58, 723–729.

Quintero, K. Estudio de la  $\beta$ -Glucosidasa en condiciones de curado de Vainilla. (2014) Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Ramachandra, S. R., & Ravishankar, G.A. (2000). Review: Vanilla flavour: production by convencional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 289-304.

Ranadive, A.S., Szkutnica, K., Guerrero, J.G. & Frenkel, C. (1983) Vanillin biosynthesis in vanilla bean. IX International Congress of Essential Oils. Singapore. Proceedings of the Congress, Book 147.

Rosado-Zarraba, Salgado-Cervantes, M., Robles-Olvera, J., García-Alvarado, M. & Rodríguez-Jimenes, G. (2007) Efecto del tipo de marchitamiento en la evolución de los compuestos aromáticos en un beneficio controlado de vainilla (*Vanilla planifolia*). V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. 1072-1080.

SIAP. SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL,

PESCA Y ALIMENTACIÓN disponible en <http://www.siap.gob.mx/> consultado 5 octubre de 2014

Soto Arenas, M. A. (2006). La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. Biodiversitas 66, 1-9

Stryer, L., Berg, J. & Tymoczko, J. (2003). Bioquímica. (5ª ed.) Barcelona: Reverté.

Tapia-Ochoategui, A. (2011). Cambios bioquímicos y microestructurales en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae) durante el beneficio tradicional realizado en México". Tesis de Doctor en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Ueda, M., & Yamamura, S. (2000). Chemistry and biology of plant leaf movements. *Angewandte Chemie International* 39, 1400–1414.

Wild-Altamirano, C. (1969). Enzymic activity during growth of vanilla fruit. I. Proteinase, glucosidase, peroxidase, and polyphenoloxidase. *Journal of Food Science* 34, 235–238.

Woodward, J., y Wiseman, A. (1982). Fungal and other b-glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 4, 73–79.

## **Anexo A**

### **ANOVA y método Turkey**

Un análisis de varianza (ANOVA) prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Para ejecutar un ANOVA, debe tener una variable de respuesta continua y al menos un factor categórico con dos o más niveles. Los análisis ANOVA requieren datos de poblaciones que sigan una distribución aproximadamente normal con varianzas iguales entre los niveles de factores.

Si el valor  $p$  es menor que el nivel de significancia, entonces se concluye que al menos una media es diferente. Para obtener información más detallada sobre las diferencias entre medias, se utiliza un método de comparaciones múltiples como el de Tukey. En este método se crean intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles.