

# Efecto del beneficiado en la calidad aromática de la vainilla (*Vanilla planifolia*)

P. Jose Marcelino<sup>1</sup>, Ma. A. Vivar Vera<sup>1</sup>, E. Paz Gamboa<sup>1</sup>, F. B. Tavares González<sup>1</sup>, A. Pérez Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Av. DR. Víctor Bravo Ahuja, S/N. Col. 5 de Mayo. CP. 68350, Tuxtepec, Oaxaca, México. Tel. +52(012878751044)

\*apsilva@hotmail.com

Área de participación: Ingeniería Química

## Resumen

El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto del beneficiado en la calidad aromática de la vainilla. Cuatro lotes de frutos de vainilla con 36 semanas de madurez fueron analizados. La longitud promedio de los frutos fue de  $20.7 \pm 0.0$  cm y una humedad inicial de  $82.9 \pm 1.2\%$ . Estos se sometieron a 4 procesos de beneficiado: tradicional, bourbon (dos temperaturas) y tecnificado. Los frutos presentaron una actividad enzimática inicial de  $\beta$ -glucosidasas y peroxidasas de 975 nKatal/g y 9.25 U/mg peso fresco, respectivamente. La actividad de la  $\beta$ -glucosidasas no pudo ser medida después del primer tratamiento térmico. La actividad final de las peroxidasas para el beneficiado tradicional, Bourbon a  $80^\circ\text{C}/15$  seg, Bourbon  $60^\circ\text{C}/3$  min y tecnificado fue de 9.71, 10.0, 10.21 y 9.23 U/mg p.f, respectivamente. Los mayores contenido de vainillina en las vainas fueron de 5.05 y 4.03 g/100g ms, provenientes de los beneficiados tecnificado y tradicional, respectivamente.

**Palabras clave:** Vainilla, Beneficiado, Vainillina

## Abstrac

*The objective of the project was to evaluate the effect of the curing on the aromatic quality of vanilla. Four batches of vanilla fruit with 36 weeks of ripening were analyzed. The average length of the fruits was  $20.7 \pm 0.0$  cm, there is a humidity of  $82.9 \pm 1.2\%$ . There must be 4 beneficiary processes: traditional, bourbon (two temperatures) and technified. The present fruits have an initial enzymatic activity of  $\beta$ -glucosides and peroxides of 975 nKatal/g and 9.25 U/mg fresh weight, respectively. The activity of  $\beta$ -glucosides could not be measured after the first heat treatment. The final activity of peroxidases for the traditional beneficiary, Bourbon has  $80^\circ\text{C}/15$  secs, Bourbon  $60^\circ\text{C}/3$  min and technified was 9.71, 10.0, 10.21 and 9.23 U/mg pf, respectively. The mayors containing vanillin in the pods were 5.05 and 4.03 g/100g m.s, they come from the technified and traditional beneficiaries, respectively.*

**Key words:** Vanilla, Curing, Vanillin

## Introducción

La *Vanilla planifolia* es una orquídea tropical nativa de México sus frutos son comercializados alrededor del mundo por su apreciable aroma. Su uso es extenso debido a que es empleada en la industria alimenticia e industria de perfumes como ingrediente de fragancias. Además la vainilla no solo posee cualidades de aroma, también presenta propiedades bioactivas, al actuar como un agente antimicrobiano, antimutagénico y antioxidante [Ramachandra y Ravishankar, 2000] y [Shyamala y col., 2007]. La vainilla para su venta y exportación necesita de cuidados minuciosos durante el proceso de beneficiado ya que de esto depende una buena calidad, teniendo en cuenta su humedad, tamaño y el contenido de vainillina [NMX-FF-074-SCFI-2009]. Para que los frutos verdes de vainilla desarrollen su aroma característico deben ser sometidos a un proceso llamado beneficiado, en el cual los  $\beta$ -glucósidos entran en contacto con las enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -glucosidasas) que se encargan de la liberación del principal fenol volátil (vainillina) responsable del aroma a vainilla y enzimas oxidativas (polifenoloxidasas y peroxidasas) que participan en los cambios de color. Existen diferentes métodos de beneficiado (Mexicano, Bourbon, Tecnificado, entre otros) de acuerdo al país productor de vainilla, pero este en general consta de consta de 4 etapas: marchitamiento, sudado, secado y acondicionamiento. Durante las etapas del beneficiado existe la pérdida de más del 60 % del principal fenol volátil, que puede ser explicado por reacciones de transformación de la vainillina a otros compuestos fenólicos, que podrían conferirle una importante actividad antioxidante a la vainilla. El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto del beneficiado en la calidad aromática de la vainilla, con la finalidad de proponer una mejora de este proceso al sector productivo.

## Metodología

Se usaron 4 lotes de 5 kg cada uno de frutos maduros de vainilla (*Vanilla planifolia*) recolectados en la región de la Chinantla. Estas muestras fueron trasladadas al Instituto Tecnológico de Tuxtepec donde fueron despezonadas, seleccionadas y clasificadas de acuerdo a su tamaño.

### Determinación de humedad

La determinación del contenido de humedad de los frutos y de las vainas recolectadas en las diferentes etapas. Se pesó 1 g de vaina en una balanza analítica, posteriormente las muestras fueron depositadas en charolas a peso constante en una estufa BINDER a 110 °C durante 24 h.

### Beneficiado tradicional de las vainas y método bourbon

Los vainas (frutos maduros) fueron colocadas en bolsas de polietileno, puestos sobre un plástico negro y expuestas a los rayos del sol para generar su marchitamiento, a una temperatura de 30–45 °C, en un periodo de 4-5 h durante 3 días. Posteriormente las bolsas con las vainas fueron guardadas en un cajón sudador en un periodo de 18 h, para empezar el proceso de sudado. Una vez pasado el marchitado, las vainas fueron sacadas de la bolsa exponiéndolas al sol de manera directa a una temperatura ambiente durante 4 h. El sudado y el secado de las vainas se alternó durante 60 días. Finalmente el acondicionamiento se realizó durante 27 días, cubriendo las vainas con mantas a temperatura ambiente y oreándolas periódicamente.

Para el método bourbon se siguió el mismo proceso de beneficiado tradicional, el cual consistió con un marchitado en inmersión en agua caliente a 80 °C/15 segundos y 60 °C/3 minutos.

### Beneficiado tecnificado

El beneficio controlado consistió de tres partes, la primera etapa del marchitamiento fue por congelación en nitrógeno líquido /1 min. La segunda etapa del proceso, las vainas fueron colocadas en cámaras controladas de temperatura y humedad relativa (40° C y 85 % HR) durante 7 días, dicha etapa representó la etapa de sudado del beneficio tradicional. Por último en la tercera etapa las vainas se colocaron a 40° C y 75 % HR hasta que alcanzaron humedades de 35 - 40 % aproximadamente. Esta condición representó la etapa del secado. Las vainas que terminaron el proceso del beneficio se colocaron en bolsas de celofán a temperatura ambiente (25 °C) para su almacenamiento.

### Determinación de la actividad enzimática de la $\beta$ -glucosidasa y peroxidasa (PER)

Se tomaron 15 g de vainas verdes, se diluyó y mezcló en una licuadora por 1 minuto con 150 mL de buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7, posteriormente se filtró con papel filtró Whatman No. 4, se tomaron 50  $\mu$ L de esta solución para diluir en 10 mL de buffer de fosfato de sodio. La actividad de la enzima se determinó incubando 0.2 mL de *p*-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranosido (*p*NPG) 4 mM en solución de fosfato de sodio 0.1 M a pH 7 con 0.2 mL de la solución enzimática diluida durante un tiempo de 20 minutos a 40 °C. Después de este tiempo la reacción se detuvo por adición de una solución de NaOH 0.5 M y la absorbancia fue evaluada a 400 nm en un espectrofotómetro.

**La actividad de la Peroxidasa:** Se determinó mediante una mezcla de reacción que consistió de 100  $\mu$ L de extracto enzimático, buffer de fosfato pH 6.8, peróxido de hidrógeno al 1% más guayacol al 4%. Y posteriormente realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm para que finalmente los resultados de la actividad enzimática sean expresados como: U/mg p.f (peso fresco)

### Cuantificación de vainillina y principales fenoles volátiles por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se pesaron 300 mg de polvo de vainilla, los cuales fueron extraídos con una mezcla de solventes metanol-agua, la mezcla fue sometida a efectos ultrasónicos en el equipo Elmasonic P, modelo D78224 a temperatura ambiente con una frecuencia de 34 Khz durante 10 minutos, los extractos fueron pasados a través de un filtro de 120 mm y 0.45  $\mu$ m de diámetro [Pérez-Silva y col., 2011]. Cada extracción fue realizada por triplicado, y posteriormente fueron analizadas en un (HPLC-DAD).

## Resultados y discusión

### Características físicas de las vainas de vainilla verde

Los frutos de vainilla tuvieron una longitud promedio de  $20.7 \pm 0.0$  cm, un diámetro de  $4.6 \pm 0.0$  cm y un peso de  $23.2 \pm 0.0$  g (Figura 1). Estudios realizados indican que estas cifras pueden variar dependiendo de factores genéticos, la fisiología de la planta y las condiciones ambientales [Lapeyre y col., 2010].



Figura 1: Lote y longitud de los frutos (*Vanilla planifolia*)

### Evolución del contenido de humedad de las vainas de vainilla durante su beneficiado

El contenido de humedad inicial de las vainas verdes maduras recolectadas de la región de la Chinantla fue de  $82.9 \pm 1.26$  %. Las vainas de vainilla fueron sometidas a un proceso de beneficiado. Durante la primera semana del beneficiado se observa una diferencia en el contenido de humedad para el lote de inmersión en nitrógeno líquido que disminuyó a un 63% mientras los otros lotes es menor la pérdida de humedad (Figura 2). Sin embargo, el contenido de humedad a partir de la semana 8 disminuyó significativamente para el lote escaldado a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las vainas alcanzaron temperaturas de  $30\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cabe mencionar que durante la semana 7 y 8 las vainas de inmersión en nitrógeno ya no continuaron con la etapa del secado y pasaron directo al afinado.

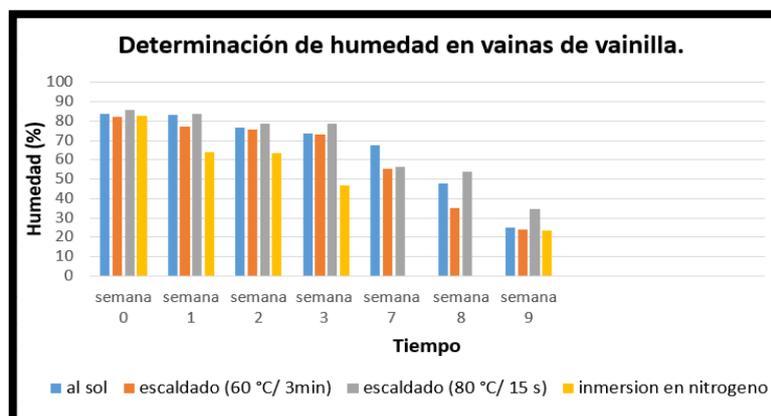


Figura 2: Evolución del contenido de humedad en los diferentes tipos de marchitamiento

### Beneficiado de las vainas de vainilla

Los primeros cambios observado en las vainas sometidas a diferentes tratamientos de marchitado fueron en aroma y en el color. En la Figura 3 se puede observar un color café oscuro en las vainas ya que esto se debe a la acción de enzimas oxidativas (polifenoloxidasas) que actúan mediante dos reacciones: 1) hidroxilando a los fenoles a o-difenoles y 2) oxidando a los difenoles para formar o-quinonas, las cuales son muy reactivas y originan pigmentos de color café.



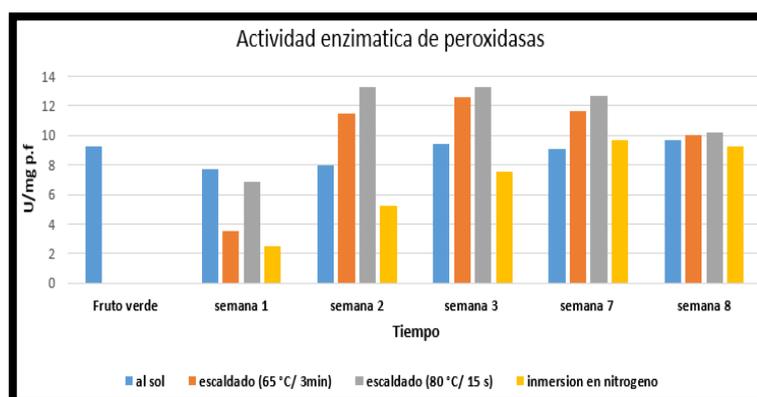
**Figura 3: Cambios físicos de las vainas de vainilla durante el proceso de beneficiado**

### Determinación de la actividad enzimática de la $\beta$ -Glucosidasas

La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa juega un papel importante en la vaina debido a que participa en la hidrólisis de los glucósidos. La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa es medida utilizando como sustratos el *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido [Oduox y col., 2003b]. Los frutos maduros presentaron una actividad enzimática de 975 nKatal/g. Este resultado tuvo tendencia similar a los reportados por Odoux y col. [2006], quienes reportaron una actividad de  $\beta$ -glucosidasa de 900 nKatal/g en frutos maduros procedentes de Madagascar y a los reportados por Pérez-Silva y col. [2006] en vainas maduras de México, ambos estudios utilizaron como sustrato *p*-NPG. Lo que permite reafirmar que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa debe ser considerada como un parámetro de calidad importante durante la cosecha de los frutos, debido a su participación en la hidrólisis de los glucósidos (precursores aromáticos) en las primeras etapas del beneficiado. Cabe mencionar que durante el beneficiado de las vainas, la actividad de las  $\beta$ -glucosidasa es inhibida completamente por las temperaturas que se alcanzan y la actividad residual no puede ser medida con el método establecido.

### Actividad enzimática de la peroxidasa

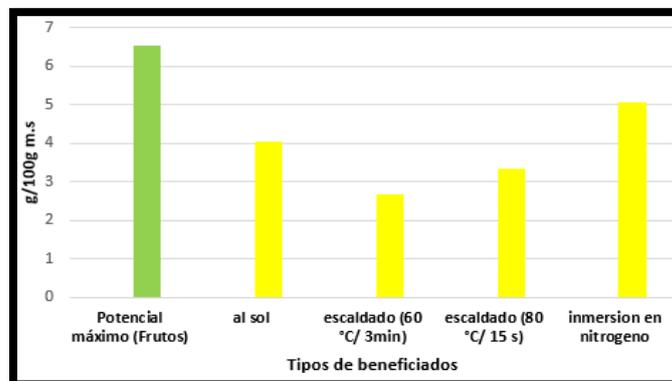
La actividad enzimática de las peroxidasa es importante ya que ésta es una enzima que cataliza la reacción de óxido-reducción entre peróxido de hidrógeno y una gran variedad de donadores de hidrógeno como los fenoles, aminas aromáticas y otros. También interviene de manera eficiente en reacciones de dimerización de algunos compuestos volátiles que están presentes en la vainilla, como es el caso de la dimerización de la vainillina para formar divainillina [Gatfield y col. 2006; Dunphy y col. 2010]. Los frutos verdes presentaron una actividad enzimática inicial de 9.25 U/mg peso fresco. Sin embargo, en la semana 1 la actividad de las peroxidasa disminuyó drásticamente debido al tratamiento térmico aplicado (marchitado) (Figura 4), en las semanas 2 y 3 se observó un aumento que fue constante durante todo el beneficiado, hasta la semana 8. Esto puede deberse a la temperatura adecuada y al contenido de humedad presente que permitieron generar condiciones apropiadas para mejorar la actividad enzimática de las peroxidasa [Márquez y col., 2008].



**Figura 4: Actividad enzimática de las peroxidasa durante el proceso de beneficiado**

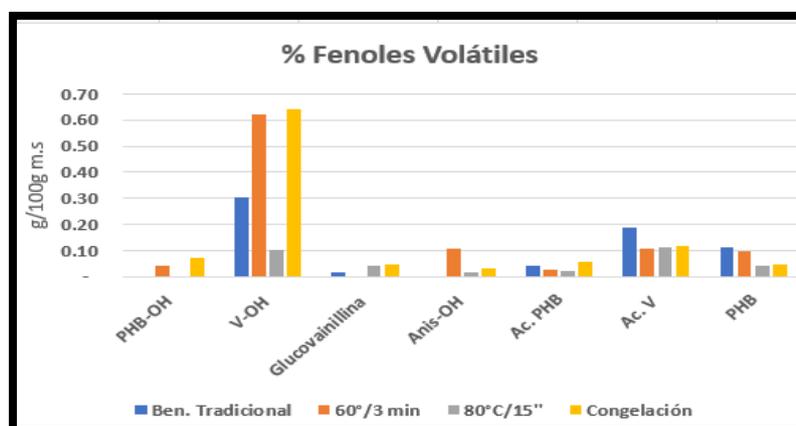
### Potencial y perfil aromático de los frutos y vainas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)

Los frutos obtenidos presentaron un potencial máximo en vainillina de 6.53%. Las vainas con los dos mayores contenidos de vainilla fueron las vainas sometidas a los beneficiado tradicional y tecnificado, 4.03 y 5.05 g/100 g m.s, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5. Potencial de vainillina en frutos y contenido de vainillina en las vainas sometidas en diferentes procesos de beneficiado.**

El vainillil alcohol (V-OH) fue el segundo compuesto en importancia cuantitativa, siendo mayor en el beneficiado a 60 °C/3min y en el tecnificado. El mayor contenido de ácido vainillínico (Ac.V) fue identificado en el beneficiado tradicional. El p-hidroxibenzaldehído (PHB) fue mayor en las vainas provenientes del beneficiado a 60 °C/3min y en el tecnificado, El ácido p-hidrocibenzoico (Ac.PHB) fue identificado en concentraciones similares en todas las vainas. Sin embargo, el p-hidroxibencil alcohol (PHB-OH) solo fue cuantificado en las vainas de los beneficiados bourbon y tecnificado. Sin embargo, el anisil alcohol (Anis-OH) no fue detectado en el beneficiado tradicional, la mayor concentración fue detectada en el beneficiado a 60 °C/3min. Se detectaron restos de glucovainillina en los tratamientos, a excepción en las vainas provenientes del beneficiado bourbon a 60 °C/3min (Figura 6).



**Figura 6: Relación de los compuestos aromáticos encontrados en vainas sometidas a diferentes tipos de beneficiados**

El aroma natural de la vainilla es muy complejo y se debe a una mezcla de diferentes compuestos volátiles y no solos a la presencia de la vainillina, como lo reportan Pérez-Silva y col. [2006] y Zhang y Mueller [2012]. Estos compuestos en las vainas beneficiadas se utilizan como un indicador de la calidad para fines comerciales [Pérez-Silva y col., 2006]. Es evidente que el perfil aromático de las vainas depende de las condiciones del beneficiado al cual son sometidas las vainas.

## Trabajo a futuro

Es pertinente realizar la cuantificación de polifenoles solubles totales, perfil aromático por GM-MS y la evaluación sensorial de las vainas mediante un perfil Flash.

## Conclusiones

El tipo de marchitado de los frutos maduros de vainilla tiene efecto sobre la hidrólisis de sus precursores aromáticos. Los tratamientos de marchitamiento (congelación y al sol) son los que producen mayores concentraciones de vainillina durante el proceso de beneficio. Trabajar en condiciones controladas de humedad relativa y temperatura, combinado con un tipo de marchitado efectivo, permite obtener contenidos de vainillina mayores a los observados en un beneficio tradicional y bourbon.

## Agradecimientos

Al FORDECYT por el financiamiento otorgado en el proyecto de “Estrategias para la adaptación y mitigación al cambio climático necesarias para el rescate del cultivo de vainilla en México” con número de registro 297884 y al CONACYT por la beca otorgada al estudiante Pedro José Marcelino durante sus estudios de Maestría.

## Referencias

1. Dunphy P., Bala K. (2010). Review: A Flavor of Vanilla Aroma, taste and mouthfeel. *Perfumer & Flavorist*. (35) 42-49.
2. Gatfield, I., Reiss, I., Krammer, G., Schmidt, C. O., Kindel, G., & Bertram, H. J. (2006). Novel taste-active component of fermented vanilla beans. *Perfumer & Flavorist*, (31) 18–20.
3. Norma Oficial Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009. Productos No Industrializados para Uso Humano– Vainilla– [Vanilla fragans (Salisbury) Ames Especificaciones y Métodos de Prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de Federación el 13 de noviembre de 2009.
4. Odoux, E., Chauwin, A., & Brillouet, J. M. (2003). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -D-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3168-3173.
5. Odoux, É. (2006). Glucosylated aroma precursors and glucosidase (s) in vanilla bean (*Vanilla planifolia* G. Jackson). *Fruits*, 61(3), 171-184.
6. Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenez, G., Robles-Olvera, V., et al. 2006. GC–MS and GC–Olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, (99) 728–735.
7. Perez-Silva, A., Gunata, Z., Lepoutre, J. P., Odoux, E. (2011). New insight on the genesis of odor active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Research International*. (44) 2930-2937.
8. Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 289-304.
9. Shyamal B. N., Madhava Naidu A.M., Sulochanamma G., Srinivas P. (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.* (55) 7738–7743.
10. Zhang, S., Mueller, C., (2012) Comparative Analysis of Volatiles in Traditionally Cured Bourbon and Ugandan Vanilla Bean (*Vanilla planifolia*) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (60) 10433–10444.