

(S8-P47)

EFFECTO DEL TIPO DE MARCHITAMIENTO EN LA EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS AROMATICOS EN UN BENEFICIO CONTROLADO DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)

THELMA L. ROSADO-ZARRABAL, MARCO A. SALGADO-CERVANTES, VÍCTOR J. ROBLES-OLVERA, MIGUEL A. GARCÍA-ALVARADO y GUADALUPE DEL C. RODRIGUEZ-JIMENES

Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA)
Calzada Miguel Angel de Quevedo 2779. C.P. 91860 Veracruz, México. lupitarj@itver.edu.mx.
Tel. 52 (229) 9341469 ext. 104, Fax. 52 (229) 9345701

Palabras clave: vainillina – glucovainillina - ácido vainillico – horneado - escaldado en agua - congelación en N₂ líquido

RESUMEN

El proceso de transformación de vainilla verde a beneficiada consta de cuatro etapas: Marchitamiento, Sudado, Secado y Acondicionamiento. El objetivo del marchitamiento es provocar la muerte de la fase vegetativa del fruto con el propósito de que enzimas y sustratos entren en contacto y se inicie la formación de los compuestos aromáticos. En la actualidad esta etapa no ha sido muy estudiada y se desconoce su influencia sobre la calidad final de la vaina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los diferentes tipos de marchitamiento en la evolución de los principales compuestos aromáticos durante un beneficio controlado. Las vainas de vainilla fueron marchitadas por diferentes métodos: escaldado en agua (90-100° C, 10-20 s), horneado (60° C, 48 h) y congelación (N₂ líquido, 1 min). Al final de esta etapa, las vainas fueron colocadas en cámaras controladas de temperatura y humedad relativa (HR): la primera semana a 40° C y 85 % HR, posteriormente a 40° C - 75 % HR hasta que alcanzaron humedades de 35 - 40 %. Las concentraciones de glucovainillina, vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vainillico y ácido *p*-hidroxibenzoico fueron cuantificadas por HPLC y el contenido de humedad fue analizado por pérdida de peso.

Los resultados mostraron que las vainas marchitadas en condiciones extremas de temperatura (congelación e inmersión) obtuvieron mayores concentraciones de vainillina (4 % b.s.) debido probablemente a una mayor ruptura de la pared celular por lo tanto un mejor contacto enzima- sustrato. La conversión del precursor principal (glucovainillina) fue mayor en estos tratamientos. En relación a los demás compuestos aromáticos evaluados, las concentraciones obtenidas en todos los tratamientos fueron muy similares a las obtenidas en un beneficio tradicional. A partir de estos resultados se concluye que una elección adecuada del tipo de marchitamiento es necesaria para maximizar la formación del compuesto principal: la vainillina.

EFFECT OF KILLING METHOD OF VANILLA (*Vanilla planifolia*) BEANS ON THE AROMA COMPOUNDS EVOLUTION DURING CONTROLLED CURING

Key words: vanillin – glucovanillin - vanillic acid – baking – scalding - freezing in liquid nitrogen

ABSTRACT

The transformation of green vanilla pods to cured vanilla is carried out in four steps: killing, sweating, drying and conditioning. Killing objective is lead to vegetative death to meet in contact enzymes and substrates for aroma compounds formation. Actually, this curing step has not been well studied and its influence on final quality of cured vanilla beans is not well known. Therefore the objective of this work was to evaluate the effect of different killing methods of vanilla beans on the evolution of main aroma compounds during a controlled curing process. Vanilla pods were killed by: scalding (90-100 °C, 10-20 s), baking (60 °C, 48 h) and freezing (N₂ liquid, 1 min). After killing, vanilla pods were placed one week at 40 °C and 85 % of relative humidity (RH), then at 40 °C and 75 % RH until to reach 35 – 40 % RH. Glucovanillin, vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid and *p*-hydroxybenzoic acid concentrations were determined by HPLC and humidity content was calculated by lost weigh. Results shown that greater vanillin concentrations (4 % dm) were obtained when extreme temperatures were used to kill vanilla pods, perhaps at this conditions cellular wall is more affected producing a better contact between enzyme and substrate. Conversion of main precursor (glucovanillin) was greater in these treatments. The concentrations of other aroma compounds, in all conditions, were similar to those obtained by traditional curing. From these results, it is evident that a good choice for killing method is necessary to maximize the vanillin production.

INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vainilla planifolia* A.) es un saborizante de gran importancia debido a su utilización en diferentes industrias: alimentaria, licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera y la artesanal. Esta planta es originaria de México y Centroamérica, sin embargo el cultivo de la vainilla se ha extendido a todo el mundo de modo que en la actualidad los principales países productores son Madagascar, Indonesia, China, Comores y en menor medida Tonga, Reunión, Turquía y Guadalupe. (Musalem, 2002). El proceso artesanal de transformación de la vainilla, llamado beneficio o curado, tiene una duración de cuatro a seis meses, durante el cual las vainas se procesan en cuatro etapas: marchitamiento, sudado, secado y acondicionamiento. Este proceso se realiza con el fin de favorecer las reacciones químicas, bioquímicas y enzimáticas que generan la formación de compuestos aromáticos de la vainilla (Dignum *et al.*, 2001 y Frenkel *et al.*, 2004), desarrollándose además su flexibilidad, esplendor y color café característico.

El marchitamiento, primera etapa del beneficio, consiste en detener el proceso normal de maduración y desarrollo del fruto, provocando la muerte fisiológica de la vaina. El objetivo principal es evitar que las vainas beneficiadas se abran para diseminar las semillas como parte de su ciclo vital, y romper la estructura de la célula de manera que las enzimas entren en contacto con los sustratos, e inicien las reacciones enzimáticas, las cuales son responsables de la producción del aroma y sabor a vainilla (Ranadive 1994, Kanisawa *et al.*, 1994, Rao y Ravishankar 2000). En la actualidad existen diversos métodos de marchitamiento reportados en la literatura, como son: calentamiento de las vainas en horno y solar, el escaldado (inmersión) en agua caliente, exposición con etileno y congelación rápida y lenta (Balls y

Arana, 1941; Ansaldi *et al.*, 1990; Dignum *et al.* 2001; Odoux, 2006; Havkin-Frenkel y Chaim Frenkel, 2006) pero sólo algunos son utilizados a nivel artesanal e industrial, como es el caso del horno y la exposición al sol por ser métodos más prácticos.

Cada método de marchitamiento tiene diferentes condiciones de operación. Balls y Arana (1941) reportaron diferentes métodos como el de inmersión en agua a 80 ° C durante 10 segundos, entre otros, sin embargo los autores no reportan los efectos que se tuvieron en cada tratamiento en relación con la calidad del producto final, ya que su objetivo era estudiar la evolución de la actividad de peroxidasa en cada tratamiento. Broderick (1956) utilizó inmersión en agua caliente a 65 ° C en un tiempo de 2 a 3 minutos, y en literatura más reciente (Rao y Ravishankar, 2000) reportan que se puede realizar la inmersión a 80 ° C, de 7 a 15 minutos. Condiciones muy similares también fueron evaluadas por otros autores (Dignum *et al.*, 2002); a diferencia de otros trabajos ellos reportan la concentraciones de vainillina y otros compuestos aromáticos en el producto final pero solo utilizaron una condición de inmersión, 80 ° C durante 20 minutos. En el marchitamiento por horno, las temperaturas utilizadas no son muy diferentes entre las reportadas por diversos autores: Kaul (1967) reportó que las vainas se pueden hornear durante 1 día a una temperatura de 65 - 70 ° C. Mientras que Karas *et al.* (1972) establecieron temperaturas de 35 a 65 ° C, en un tiempo de 72 h. Recientemente Musalem (2002) reportó que en México se utiliza el horno en condiciones de 24 a 48 h y temperatura de 60 ° C. Sin embargo, el horneado presenta algunos inconvenientes como heterogeneidad en el calentamiento del fruto por lo se debe tener un control estricto sobre temperatura, disposición del producto en el horno y tiempo de proceso. Hasta ahora no se han encontrado reportes bibliográficos que muestren las ventajas o desventajas de utilizar éste método. Otro tipo de marchitamiento mencionado en la literatura es la congelación, ésta puede ser lenta o rápida, sin embargo en el beneficio tradicional casi no se utiliza. Balls y Arana (1941) reportaron una congelación lenta de 16 h; Ansaldi *et al.* (1990) reportan este método, sumergiendo las vainas en nitrógeno líquido o manteniendo las vainas en un congelador (0 a -80 ° C) durante unas horas, sin embargo solo es recomendado para cantidades pequeñas de vainilla por el tipo de material y equipos que se utilizan. Dignum *et al.* (2001) indican que el congelamiento de las vainas debe efectuarse a alrededor de -70 ° C o menos, con el objetivo de preservar la viabilidad de las enzimas que son involucradas en el proceso de beneficio. Por último Odoux *et al.* (2006) evaluaron la actividad de la β -glucosidasa y el contenido de vainillina en diferentes tipos de marchitamientos siendo uno de ellos la congelación realizada a -18 ° C durante 3 días, pero no continuaron su estudio en las etapas restantes del proceso del beneficio.

Es importante enfatizar que en los trabajos discutidos, no se reporta la influencia del tipo de marchitamiento sobre la calidad del producto final, a pesar de haber evidencia de ser en esta etapa donde se propician las condiciones para iniciar las reacciones necesarias para la formación de los compuestos aromáticos. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los diferentes tipos de marchitamiento en la evolución de los principales compuestos aromáticos durante un beneficio controlado a nivel laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima.

Para este estudio se utilizó vainilla de la región de Gutiérrez Zamora, Veracruz, México; donada por la Industria Gaya. Se trabajó con un lote de 10 kg. de vainilla verde que se encontraba en el estado de madurez adecuado (alrededor de 9 meses) para su proceso de beneficio (Broderick, 1956). Al inicio del tratamiento se colocaron 30 vainas por cada tratamiento y periódicamente se tomaron muestras de 100 g aproximadamente para su determinación de humedad, glucovainillina, vainillina, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-

hidroxibenzaldehído y ácido vainílico. Todos los análisis se realizaron por triplicado y un análisis de varianza fue realizado.

Beneficio Controlado

El beneficio controlado consistió de tres partes, en la primera etapa del marchitamiento se evaluaron tres métodos: horneado (60 °C, 48 h), inmersión en agua caliente (90 - 100 °C, 10- 20 s) y congelación con nitrógeno líquido (1 min). También se evaluó un tratamiento sin ningún tipo de marchitamiento como un lote testigo. 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 humedad.

El análisis de la humedad se realizó por la técnica reportada por Ruiz-Terán *et al.* (2001). 1 g de vainilla fue cortada en piezas de aproximadamente 0.5 cm y congeladas a -30 °C durante 12 h. Posteriormente se colocaron en un liofilizador (Labconco) hasta obtener peso constante. La cuantificación fue reportada como la diferencia entre el peso inicial y final de 1 g de vaina en base seca.

Determinación de glucovainillina y compuestos aromáticos.

Se realizó una extracción, utilizando 300 mg de vaina (materia seca) pulverizada con nitrógeno líquido. Se le adicionó 100 mL de una solución compuesta de 35 % metanol- 65 % ácido fosfórico 0.01 M. Posteriormente se homogenizó con un sonicador durante 15 min. La solución fue filtrada en papel y diluida 5 veces con la solución de la mezcla metanol-ácido fosfórico. Por último la solución diluida fue filtrada nuevamente con un filtro 0.22 µm antes de la inyección en HPLC.

La cuantificación de los compuestos aromáticos y del precursor fue realizada en un HPLC (Varian Prostar 363), con una columna microsorb C18 de 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud a 30 °C. La fase móvil fue una mezcla de 22 % metanol y 78 % de ácido fosfórico 0.01 M, con un flujo de 0.7 mL/min, manteniendo una presión de 80 atm. Un detector UV fue utilizado a una longitud de onda de 230 nm. El análisis de los compuestos fue realizada bajo la técnica del estándar externo a partir de una curva de calibración. Los estándares utilizados en cromatografía líquida fueron grado reactivo y comprados a Sigma-Aldrich: vainillina, ácido *p*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzaldehído, a excepción del ácido vainílico y glucovainillina que fueron aportados por el Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en relación a la humedad durante el beneficio controlado muestran que no existe una diferencia significativa entre los tres tipos de marchitamientos evaluados como se puede observar en la Figura 1. No obstante se aprecia una diferencia en el lote testigo (sin marchitamiento), este fenómeno se debió a que las vainas presentaron defectos físicos, principalmente apertura en su superficie (como es de esperar de acuerdo con su ciclo vital), lo que originó una mayor disponibilidad a la eliminación del agua y aumentó la velocidad de deshidratación. Sin embargo, esto no es conveniente para el proceso de beneficio de vainilla ya que éste tipo de vainas representa una mala la calidad del producto final.

Con las condiciones propuestas del beneficio controlado (evaluadas en estudios anteriores) el tiempo del proceso disminuyó considerablemente, ya que a alrededor de 50 días las vainas alcanzaron la humedad requerida para la etapa de almacenamiento; ésta reducción de tiempo es de tomarse en cuenta, debido a que en el proceso de beneficio tradicional se requieren alrededor de 3 meses para alcanzar la misma humedad y por lo tanto estos resultados podrían tener un impacto en la optimización del proceso.

La conservación de la humedad observada durante el marchitamiento también ha sido reportada por otros autores (Odoux, 2000; Dignum *et al.*, 2001 y Roling *et al.*, 2001) ya que reportan que el objetivo del marchitamiento es la ruptura de la estructura celular y no la deshidratación del fruto.

En relación al contenido de glucovainillina, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, en donde se puede apreciar que en las primeras semanas del proceso (marchitamiento – sudado) es donde se realiza la mayor hidrólisis de glucovainillina y por lo tanto la formación de los compuestos aromáticos del fruto; después de este tiempo la glucovainillina tiende a disminuir hasta quedar en cantidades traza en todos los tratamientos evaluados. Un punto importante de observar es la disminución del glucósido, ya que la velocidad de degradación fue muy similar en tratamientos térmicos extremos, como fueron el caso de congelación e inmersión, siendo diferente para el caso del horneado en el cual la velocidad de degradación fue más lenta. Estos resultados nos podrían indicar que el marchitamiento sí tiene influencia en la ruptura de la pared celular y por lo tanto en la formación del aroma de la vainilla. Estos resultados coinciden con lo observado por Odoux *et al.* (2006), aunque cabe mencionar que hay algunas diferencias en cuanto al método de congelación, ya que ellos utilizaron un método de congelación lenta y en este estudio se usó una congelación rápida. Sin embargo, con ambos métodos se cumplió el objetivo del marchitamiento satisfactoriamente.

Los resultados del contenido de vainillina en los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 1 y la figura 3. En donde se presentan las concentraciones máximas alcanzadas en cada marchitamiento, con sus respectivos días. Es importante notar que las vainas con marchitamientos extremos (congelación e inmersión) fueron los que alcanzaron las mayores concentraciones de vainillina, estos resultados concuerdan a lo observado con la degradación de la glucovainillina. En relación al lote sin marchitamiento, también se observan contenidos de vainillina mayores a los alcanzados en un beneficio tradicional (Odoux, 2000; Musalem, 2002 y Havkin-Frenkel y Chaim Frenkel, 2006). Este resultado indica que el marchitamiento no necesariamente propicia el rompimiento celular, pues como se puede observar en la Figura 2, 3 y en la Tabla 1 el consumo de glucovainillina y la producción de vainillina de vainas sin marchitar es comparable con las vainas marchitadas. Por lo tanto el objetivo del marchitamiento es detener el ciclo vital de las vainas y evitar que se abran y disminuya su calidad. Pero las vainas beneficiadas sin marchitar tienen aplicación en la obtención de extractos

Por otro lado, cabe mencionar que al final del estudio, la concentración de vainillina disminuyó durante su almacenamiento, fenómeno que también ocurre en un beneficio tradicional, esto se puede deber a varios factores como la permeabilidad del empaque, condiciones de la atmósfera, evaporación de agua y vainillina, entre otros.

En relación a los demás compuestos evaluados como fueron ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido vainílico; no se observaron diferencias significativas en cada uno de los tratamientos estudiados. Por lo que se podría decir que el tipo de marchitamiento tiene influencia sobre la hidrólisis del precursor y como consecuencia en la formación del componente principal de la vaina (vainillina).

CONCLUSIONES

El tipo de marchitamiento si tiene efecto sobre la degradación del precursor y la velocidad de formación de la vainillina. Los tratamientos de marchitamiento extremos (congelación e inmersión) son los que producen mayores concentraciones de vainillina durante el proceso de beneficio. Las vainas que no recibieron ningun tipo de marchitamiento, alcanzaron contenidos similares de vainillina durante el proceso, con la irregularidad de estar dañadas físicamente (rupturas). Trabajar con condiciones controladas de humedad relativa y temperatura, combinadas con un tipo de marchitamiento efectivo, permite obtener contenidos de vainillina mayores a los observados en un beneficio tradicional.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por haber financiado este proyecto (G35128-B) y ECOS (M03A02) y a la Agroindustria Gaya S.A. de C.V. por su aportación de materia prima para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansaldi G, Gil G, Le Petit J. 1990. Process for obtaining natural vanilla flavor by treatment of green vanilla beans, and the flavor obtained. United States Patent Office. US4956192.
- Balls, A.K y Arana, F.E. 1941. The curing of vanilla. *Ind. Eng. Chem.* 33, 1073-1075.
- Broderick JJ. 1956. The science of vanilla curing. *Food Techn.* 10: 184-187.
- Dignum MJW, Kerler J, Verpoorte R. 2001. Vanilla production: technological, chemical and biosynthetic aspects. *Food Rev. International.* 17 (2): 199-219.
- Dignum MJW, Kerler J, Verpoorte R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chem.* 79: 165-171.
- Havkin-Frenkel D, French JC, Graft NM, Pak FE, Frenkel C. 2004. Interrelation of Curing and Botany in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Bean. *Future for Medicinal and Aromatic Plants. Acta Hort.* 629: 93-102.
- Havkin-Frenkel D y Frenkel C. 2006. Postharvest handling and storage of cured vanilla beans. *Stewart Postharvest Review.* 4:6
- Kanisawa T, Tokoro K, Kawahara S. 1994. Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. Olfaction Taste XI, Proc. Int. Symp. Springer, Tokyo. 268-270.
- Karas AJ, Hall RL, Stahl WH. 1972. Vanilla bean drying and curing. United States Patent Office. US3663238.
- Kaul RJ 1967. Curing of vanilla beans. United States Patent Office. US3352690.
- Musalem, L.O. 2002. De nuestra cosecha. *Revista claridades agropecuarias.* <http://www.infoaserca.gob.mx>.
- Odoux E. 2000. Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits.* 55: 119-125.
- Odoux E, Escoute Y y Verdeil JL. 2006 The relation between glucovanillin, β -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Ann Appl Biol.* 149: 43-52.
- Ranadive AS. 1994. Vanilla-Cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. Ed. Charalambous, *Developments in Food Science.* Elsevier Science B.V., Amsterdam. Volumen 34:517-576.
- Rao SR, Ravishankar GA. 2000. Vanilla flavour: production by convencional and biotechnological routes. *J. Sci. Agric.* 80: 289-304.

- Roling WFM, Kerler J, Braster M, Apriyantono A, Stam H, Verseveld HWV. 2001. Microorganisms with a Taste for Vanilla: Microbial Ecology of Traditional Indonesian. *Vanilla Curing. Applied and Environmental Microb.* 67(5): 1995-2003.
- Ruiz-Terán F, Pérez-Amador I, López-Munguía A. 2001. Enzymatic Extraction and Transformation of Glucovanillin to vanillin from Vanilla Green Pods. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5207-5209.

TABLAS Y FIGURAS

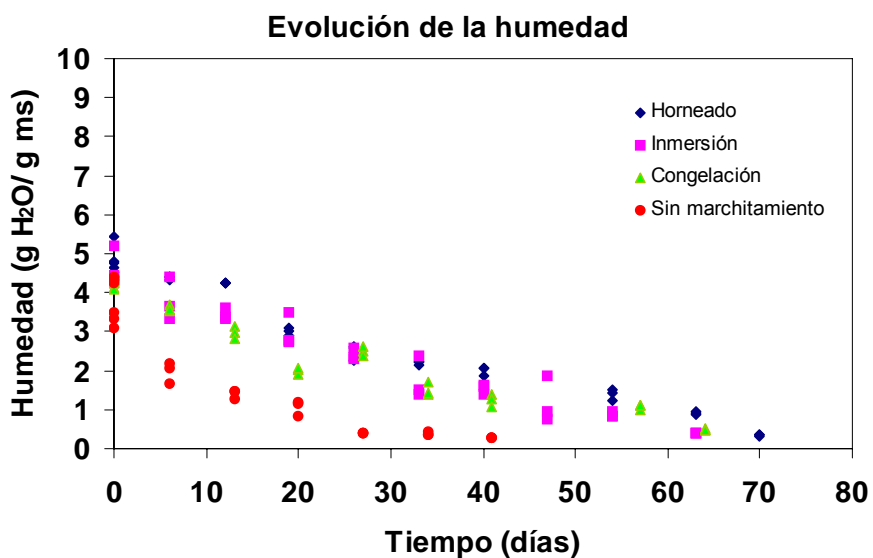


Figura 1: Evolución de la humedad en los diferentes tipos de marchitamiento

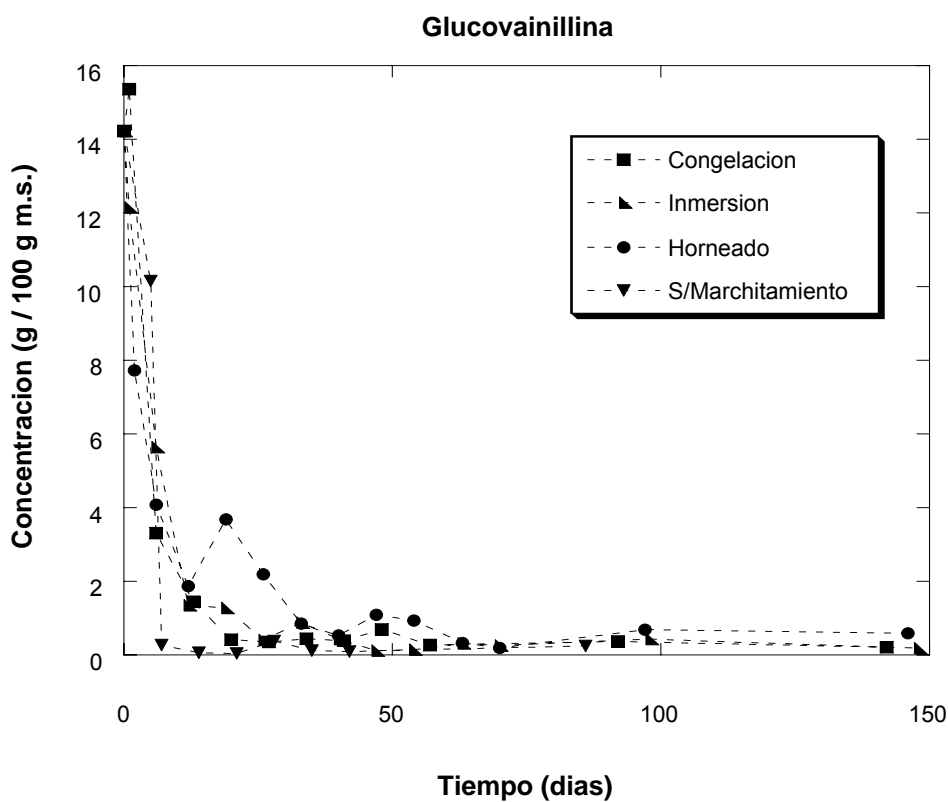


Figura 2: Evolución de glucovainillina durante el beneficio controlado.

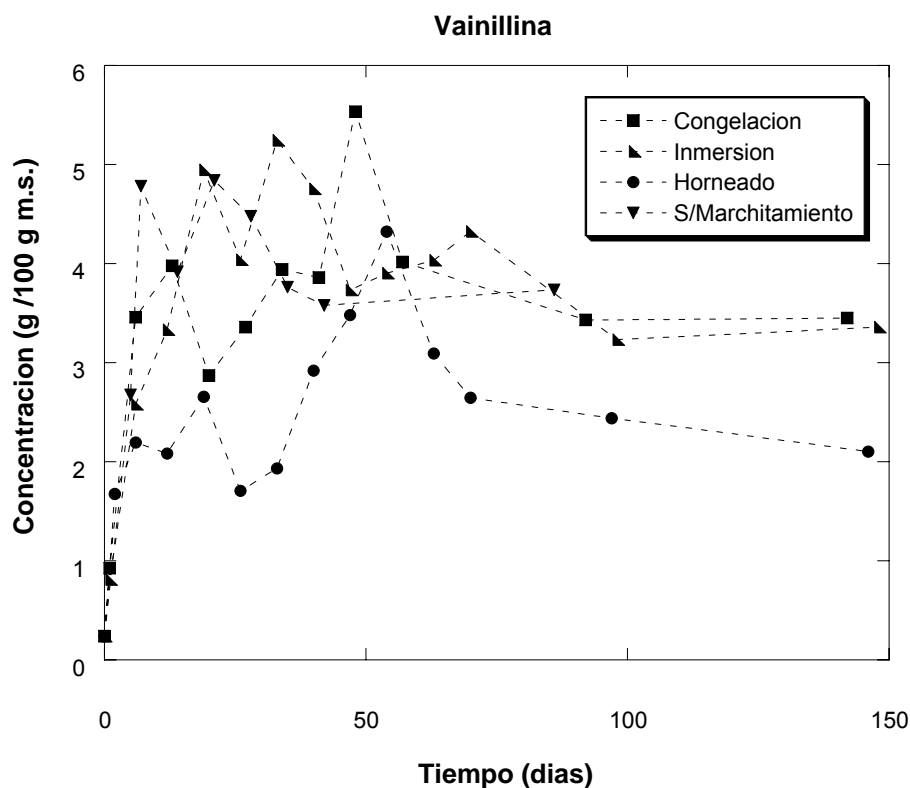


Figura 3. Evolución de la vainillina durante el beneficio controlado.

Tabla 1. Concentración de vainillina durante el beneficio controlado

Marchitamiento	Concentración máxima de Vainillina (% m.s.)	Concentración de Vainillina en almacenamiento (% m.s.)
Horneado	4,322±0,0009 (54 d)	2,101±0,0006 (146 d)
Inmersión	5,245±0,0032 (33 d)	3,361±0,0011 (148 d)
Congelación	5,534±0,0014 (48 d)	3,454 ±0,0010 (142 d)
S/Marchitamiento	4,840±0,0005 (28 d)	3,736 ±0,0002 (86 d)