

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

“ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE VAINAS DE
VAINILLA (*Vanilla planifolia*) SOMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE
BENEFICIADO”

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Presenta:

VÍCTOR HUGO BAEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR INTERNO DE TESIS

DRA. MARIA LORENA LUNA GUEVARA

DIRECTOR EXTERNO

DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

Puebla, Puebla. Septiembre 2014



C. VICTOR HUGO BÁEZ MARTÍNEZ
PASANTE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS
PRESENTE:

Oficio No. FIQ/AC/1282/2013
Asunto: Registro de Tema de Tesis
Fecha: 10 de Diciembre de 2013

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo titulo es el siguiente:

“ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE VAINAS DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)
SOMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE BENEFICIADO”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	VAINILLA
CAPÍTULO 2	MICROORGANISMOS INDICADORES Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA PRESENTE EN VAINAS DE VAINILLA
CAPÍTULO 3	BENEFICIADO DE LA VAINILLA
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

Facultad de Ingeniería Química
BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR
M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARÍA ACADÉMICA

C.c.p. Director de Tesis: Dra. María. Lorena Luna Guevara
Minutario Facultad de Ingeniería Química



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

LIC. Ma. Cristina Laura Gómez Aguirre.
Directora de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería en Alimentos:

Víctor Hugo Báez Martínez

Quién presenta como tema de tesis:

ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE VAINAS DE VAINILLA
(Vanilla Planifolia) SOMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE BENEFICIADO

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 10 de septiembre de 2014

Director de Tesis
Dra. Ma. Lorena Luna Guevara

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y por brindarme siempre su ayuda.

A mi madre y hermano por todo el apoyo, amor, dedicación y comprensión que siempre me han otorgado, ya que gracias a ellos alcance una meta más.

A Rene y Ana Brito por su gran apoyo, cariño y consejos para ser mejor cada día en todo lo que haga.

A la Dra. Lorena Luna Guevara por su gran paciencia, tiempo, conocimientos y ayuda para realizar este trabajo con gran éxito.

Al Macroproyecto Vainilla, la Implementación de estudios de inocuidad y control de procesos y su impacto sobre el perfil sensorial de la vainilla mexicana por la oportunidad y el apoyo otorgados.

Al Dr. B. Edgar Herrera Cabrera, Dr. Juan José Luna Guevara, M.C. Héctor Ruiz Espinosa y M.C. Madai Arzubide por sus asesorías, tiempo, conocimientos y ánimos para concluir con éxito este trabajo.

Al Dr. Armando Navarro Ocaña del laboratorio de patógenos entéricos, UNAM por permitirnos realizar las pruebas de identificación y confirmación bioquímica.

A mis mejores amigos Yauri Zaldivar, Isai Brito y Jovani Cervantes por estar siempre conmigo, animarme y brindarme su apoyo en las buenas y en las malas. También a mis grandes amigos Arantxa Benavides, Laura Román, Gaby Flores Cruz, Alejandra Noriega, Sandra Rascón, Gilce Castro, Criss Barrientos, Ángelo Huerta, Daniel Anteliz, Josimar Aguilar, Eduardo Castillo y Daniel Jiménez por el apoyo en toda la carrera universitaria.

Índice

	página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
Generales.....	3
Particulares.....	3
III. HIPÓTESIS.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
Capítulo 1 vainilla.....	4
Generalidades.....	4
Producción de vainilla internacional y nacional.....	5
Especificaciones de calidad microbiológica.....	6
Capítulo 2 microorganismos indicadores y su relación con la microbiota presente en vainas de vainilla.....	8
Generalidades.....	8
Microbiota presente en la vaina de vainilla.....	10
Capítulo 3 proceso de beneficiado.....	14
Etapas del beneficiado.....	15
V. METODOLOGÍA.....	21
Identificación y clasificación de los sistemas de beneficiado.....	22
Evaluación y cuantificación de los diferentes microorganismos indicadores en vainas verdes y beneficiadas.....	22
Preparación y dilución de muestras.....	23
Recuentos de grupos indicadores.....	23
Organismos coliformes totales.....	24
Bacterias mesófilas aerobias.....	24
Hongos y levaduras.....	24
Identificación bioquímica de enterobacterias.....	24
Relación de los procesos de beneficiado.....	25
Análisis de resultados.....	25
Determinación de índices de diversidad.....	25
Análisis de experimento y análisis estadístico.....	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Selección y descripción de área de estudio.....	28
Clasificación de los diferentes procesos de beneficiado.....	32

Análisis microbiológicos en vainas verdes y beneficiadas.....	38
Análisis microbiológico en vainas verdes.....	38
Análisis microbiológicos de vainas beneficiadas.....	45
CONCLUSIONES.....	61
VII BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXO.....	70

Índice de Tablas

		Página
Tabla 1	Principales países productores de vainilla.....	5
Tabla 2	Principales estados productores de vainilla de México.....	6
Tabla 3	Especificaciones de calidad y microbiológicas para vainas de vainilla beneficiada.....	7
Tabla 4	Etapas y condiciones que se consideran en los sistemas de beneficiado rústicos.....	33
Tabla 5	Etapas y condiciones que se consideran en los sistemas de beneficiado tradicional y semi tecnificado.....	37
Tabla 6	Especificaciones microbiológicas para la vainilla....	38
Tabla 7	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas verdes provenientes de diferentes localidades.....	40
Tabla 8	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas verdes provenientes de diferentes localidades considerando la etapa de enriquecimiento en caldo soya tripticaseina.....	41
Tabla 9	Índices de diversidad y microbiota presente en vainas verdes provenientes de diferentes localidades.....	44
Tabla 10	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de las diferentes localidades.....	45
Tabla 11	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de las diferentes localidades considerando la etapa de enriquecimiento en soya tripticaseina.....	48
Tabla 12	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de los diferentes sistemas de beneficiado.....	49
Tabla 13	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de los diferentes sistemas de beneficiado considerando la etapa de enriquecimiento en soya tripticaseina.....	50
Tabla 14	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en	

	vainas verdes y beneficiadas.....	50
Tabla 15	Grupos indicadores de inocuidad obtenidos en vainas verdes y beneficiadas considerando la etapa de enriquecimiento en soya	
	tripticaseina.....	51
Tabla 16	Índices de diversidad y microbiota presente en vainas beneficiadas provenientes de diferentes localidades.....	58
Tabla 17	Índices de diversidad y microbiota presente en vainas beneficiadas utilizando diferentes sistemas de beneficiado.....	59

Índice de Figuras

	Página
Figura 1	
a) Cultivo de vainilla (<i>Vanilla Planifolia</i>)	
b) Vaina de vainilla madura.....	4
Figura 2	Microorganismos indicadores..... 9
Figura 3	Hongos que se pueden encontrar en la vainilla..... 12
Figura 4	Etapas de beneficiado..... 15
Figura 5	Etapas de beneficiado..... 15
Figura 6	Diagrama general de la metodología..... 21
Figura 7	Diagrama de flujo para el recuento de microorganismos indicadores en vainas verdes y beneficiadas..... 23
Figura 8	Ubicación geográfica de la municipio de Pantepec pertenece al estado de Puebla..... 28
Figura 9	Ubicación geográfica del poblado de Puntilla Aldama pertenece al municipio de san Rafael estado de Veracruz..... 30
Figura 10	Ubicación geográfica de la comunidad de Ayotoxco pertenece al estado de Puebla..... 30
Figura 11	Ubicación geográfica del municipio de Papantla pertenece al estado de Veracruz..... 31
Figura 12	Proceso de beneficiado rústico..... 32
Figura 13	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas verdes..... 42
Figura 14	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los sistemas de beneficiado rústico..... 53
Figura 15	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los sistemas de beneficiado tradicional..... 54
Figura 16	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los sistemas de beneficiado semi tecnificado..... 55
Figura 17	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los diferentes sistemas de beneficiado..... 56
Figura 18	Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas verdes y beneficiadas..... 57

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la vainilla es originario de México, específicamente de la región del Totonacapan, donde se desarrolló la cultura totonaca. Dicha cultura consideró a la vainilla como objeto de venerados cultos y fue declarada como planta sagrada, ya que era utilizada como ofrenda divina en sus adoratorios. Fue llamada en náhuatl *tlixóchitl* y fueron los españoles quienes le dieron el nombre de vainilla, por la forma del fruto (Reyes-López, 2008).

Actualmente los diversos usos de la vainilla permiten que tenga una alta cotización internacional, considerándose en el rango de 10 a 50 mil dólares/ton de vainilla beneficiada (SAGARPA, 2010). Aunada a esta importancia económica la vaina debe mantener ciertos requisitos de calidad y dar cumplimiento con lineamientos de inocuidad. En relación con estos últimos la vainilla puede presentar crecimiento de algunas enterobacterias y manifestar enfermedades fúngicas, causando pérdidas productivas significativas en frutos verdes y beneficiados. Algunos de los géneros bacterianos importantes son *Azotobacter* sp. y *Enterobacter* sp. y entre los hongos más comunes se encuentran los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Colletotrichum* (López-López, 2012).

Para darle valor agregado al fruto verde de la vainilla las vainas son sometidas al proceso de beneficiado para su conservación, exponiéndolas ante un tratamiento de deshidratación, el cual puede ser lento en los sistemas tradicionales incluso durar hasta seis meses, dependiendo de los ciclos de sudado-secado que se implementen (INIFAP, 2010). Lo que también genera factores que contribuyen a los posibles riesgos de contaminación de la vainilla. Particularmente el manejo y la pérdida del contenido de humedad pueden ser inadecuados, lo que favorece el crecimiento de hongos y bacterias que propician el deterioro de las vainas.

Entre los microorganismos que se han aislado en vainilla beneficiada se encuentran los géneros bacterianos *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, entre otras, (Roling *et al.*, 2001). Asimismo durante el beneficiado se favorecen reacciones enzimáticas y actividades microbiológicas

que están relacionadas con el sabor y aroma de la vainilla. Las enzimas β -glucosidasas son activadas y convierten a los glucósidos en compuestos aromáticos (Kerler, 2002).

Sin embargo, poco se conoce acerca de las contribuciones microbiológicas directamente relacionadas con la calidad de la vainilla. Por lo anterior, se desconocen los cambios en los comportamientos de la microbiota presente durante el proceso de beneficiado. Este último aspecto está relacionado con la inocuidad en vainilla ya que es un factor fundamental que debe ser considerado para la búsqueda de nuevos mercados en productos como la vainilla, debido a que es asunto de mayor prioridad para consumidores y productores. De ahí que en la presente investigación se evaluó la microbiota presente en las vainas de vainilla mediante análisis microbiológicos de los grupos de indicadores como: Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA's), Hongos y Levaduras (H y L), Coliformes Totales (CT) en vainas verdes y beneficiadas. Lo anterior con la finalidad de proponer alternativas que prevengan las posibles fuentes de contaminación y se favorezca la inocuidad en las regiones productoras de vainilla y evitar grandes pérdidas económicas que se han venido desarrollando en los diferentes sistemas de beneficiado.

Asimismo la información recabada en esta investigación es importante debido a que con ella se estará dando cumplimiento con uno de los objetivos contemplados en el Macroproyecto de Investigación Aplicada para el Fortalecimiento, Innovación y Competitividad de la Producción de Vainilla en México, El cual deriva de la problemática de conservación identificada en *V. planifolia* y de la problemática del cultivo expresada por el Comité Sistema Producto Nacional de la Vainilla (CSPNV). Al Macroproyecto lo conformaron varios subproyectos incluyendo el de la Implementación de estudios de inocuidad y control de procesos y su impacto sobre el perfil sensorial de la vainilla mexicana.

II. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la calidad microbiológica en vainas de vainilla verdes y beneficiadas provenientes de los diferentes sistemas de producción ubicados en las regiones de Totonacapan de Puebla-Veracruz con la finalidad de identificar los posibles riesgos de contaminación microbiana.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Identificar y clasificar los diferentes procesos de beneficiado en el área de Totonacapan de Puebla-Veracruz.
- Evaluar y cuantificar los diferentes tipos de microorganismos indicadores como: coliformes fecales, coliformes totales, hongos y levaduras, bacterias mesófilas aerobias, e identificar las enterobacterias, aisladas con mayor frecuencia en los diferentes sistemas de beneficiado.
- Relacionar los procesos de beneficiado, considerando los indicadores de inocuidad y enterobacterias aisladas en las vainas verdes y beneficiadas.
- Determinar los índices de diversidad microbiana H' Shannon, D Simpson y $Schao$ de acuerdo con las enterobacterias aisladas en vainas verdes y beneficiadas.

III. HIPOTESIS.

El tipo de beneficiado de vainilla influye significativamente sobre el recuento de los grupos indicadores de inocuidad e índices de diversidad microbiana.

IV. MARCO TEÓRICO.

CAPITULO 1 VAINILLA

1.1 GENERALIDADES

La vainilla es una planta trepadora de la familia de las orquídeas, considerada una planta hemiepipita no parásita, es decir, que utiliza un tutor para sostenerse y así crecer (Fig.1a), su fuente de nutrición es la materia orgánica que se encuentra en la superficie terrestre (Reyes-López, 2008).

Existen alrededor de 12 especies de vainilla; la mayoría de ellas poseen características específicas en su constitución. Sin embargo, existe un significativo número de especies cuyas hojas se han reducido a escamas o están desprovistas, casi o totalmente de ellas (Curti, 1990).

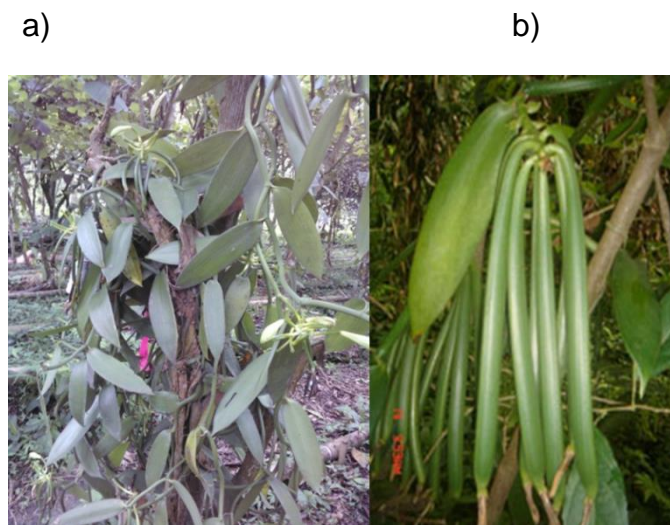


Figura 1. a) Cultivo de vainilla (*Vanilla Planifolia*).

b) Vaina de vainilla madura.

El nombre de vainilla es comúnmente conocida como *xanath*, *tlilxochitl* y flor negra. Este cultivo es originario de México y comprende un centenar de plantas

monopodiales de hábitos trepadores que llegan alcanzar más de 35 m, con hojas alternas que se extienden por toda su longitud (Curti, 1990).

El fruto de la vainilla es una vaina alargada y carnosa que crece de 10 a 20 cm, madura gradualmente posterior a la floración durante 8 a 9 meses, cada vaina contiene miles de minúsculas semillas y se tornan en una coloración negra despidiendo un fuerte aroma (Fig.1b) (Herrera-Cabrera *et al*, 2008).

La vainilla es cultivada esencialmente por su fruto, la vaina contiene un amplio contenido de compuestos aromáticos incluyendo la (vainillina). Por este perfil aromático característico la vainilla; es ampliamente utilizada en confitería, pastelería, perfumería, chocolatería, fabricación de licores finos, droguería, farmacología, confección de cigarrros, galletas, bebidas gaseosas y artesanía, entre otros. Asimismo existen reportes de que este fruto actúa como estimulante estomacal y antídoto contra el veneno de algunas plantas (FAO, 2010).

1.2 PRODUCCIÓN DE VAINILLA INTERNACIONAL Y NACIONAL

La producción de vainilla proviene sobretodo de Indonesia, Madagascar y China, en menor cantidad de México y Comoras, Particularmente México ha mantenido su producción constante durante más de cuatro años (SAGARPA, 2010). (Tabla 1)

Tabla 1: Principales países productores de vainilla (Ton año⁻¹)

PAISES	2003	2004	2005	2006	2007
INDONESIA	2,375.0	3,700.0	3,600.0	3,700.0	3,700.0
MADAGASCAR	525.0	839.0	2,613.0	2,534.0	2,600.0
CHINA	800.0	900.0	1,000.0	1,200.0	1,350.0
MEXICO	257.0	252.0	280.0	291.0	637.0
COMORAS	110.0	60.0	65.0	75.0	50.0

Fuente (SAGARPA, 2010).

Si bien en nuestro país no ha podido crecer la producción de vainilla, aportando únicamente el 1% de la producción mundial (Soto, 2006). Datos recientes sugieren

que en promedio cada productor mexicano cosecha unos 60 Kg de vainilla verde al año, lo cual es una indicación indirecta del padrón de productores. De ahí se requieran generar estrategias de producción para incrementar los rendimientos, ya que la mayoría de los frutos son cultivados en plantaciones rústicas a partir de las cuales los volúmenes obtenidos son bajos (SAGARPA, 2010).

La mayor parte de la vainilla natural se extrae de una sola especie, *Vanilla planifolia*. Esta es nativa de Chiapas, Oaxaca, Puebla y principalmente del estado de Veracruz, este último estado ha venido incrementando su producción cada año (Tabla. 2) (COVECA, 2010).

Tabla 2: Principales estados productores de Vainilla de México.
(Ton año⁻¹)

ESTADOS	2004	2005	2006	2007
VERACRUZ	176.05	205.11	188.57	590.35
PUEBLA	15.6	28.9	24.25	22.44
OAXACA	60	46	78	24.4
CHIAPAS	0.8	0.0	0.0	0.29
TOTAL	252.45	280.01	290.82	637.48

Fuente. (COVECA, 2010)

Sin embargo, existe un gran problema para nuestro país ya que Indonesia y China están utilizando métodos modernos de cultivo, teniendo mano de obra más barata que la mexicana y programas agresivos de mercadotecnia para colocar su producto al mercado antes que los demás países productores de vainilla (SAGARPA, 2010).

1.3 ESPECIFICACIONES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA

En la Tabla 3 se mencionan algunas de las especificaciones microbiológicas y de calidad que deben cumplir las vainas beneficiadas de acuerdo con la normatividad nacional vigente.

Tabla 3: Especificaciones de calidad y microbiológicas para vainas de vainilla beneficiada.

Especificaciones Microbiológicas	
Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)	<100 UFC/g
Coliformes Totales (CT)	Ausente
Hongos y Levaduras (H y L)	<10 UFC/g
Especificaciones de Calidad	
Humedad (%)	25 a 30
Color	Café Achocolatado
Aspecto	Grueso, flexible y sin manchas
Tamaño	>20 cm, mínimo 12 cm
Aroma	Dulce, suave

Fuente. (NMX-074-SCFI-1996)

CAPÍTULO 2 MICROORGANISMOS INDICADORES Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA PRESENTE EN VAINAS DE VAINILLA

2.1 GENERALIDADES

Actualmente existen programas como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) el cual incluye herramientas para la obtención de productos seguros para el consumo humano que se centralizan en la higiene (Oliver, 2007). Los programas mencionados se encuentran dirigidos a prevenir las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) las cuales se definen como aquellos padecimientos que se originan por la ingesta de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Entre los patógenos, más comunes se encuentran bacterias, virus, hongos y parásitos (OMS, 2005).

Los síntomas de las ETA's varían entre los diversos factores que pueden incidir de acuerdo al tipo de contaminación, así como también según la cantidad del alimento que ha sido contaminado. La mayoría de las ETA's pueden representar enfermedades pasajeras, que solo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación pero en ciertos casos pueden llegar a ser muy severas, dejar graves secuelas o incluso hasta provocar la muerte en personas susceptibles (Fuentes-Hernández, 2009).

Finalmente de acuerdo con la OMS (2005) la mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos para el consumidor sólo después de que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección.

Existen grupos de microorganismos conocidos como indicadores de inocuidad que principalmente sirven para analizar la calidad microbiológica en alimentos entre ellos se encuentran las bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, hongos y levaduras y organismos coliformes fecales (Fig. 2)

Las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA's) lo conforman aquellos géneros que crecen a temperaturas óptimas de 20 a 45°C y que dependen del oxígeno atmosférico para su desarrollo. (Fig. 2 a) Dentro de este grupo se encuentran

especies como *Bacillus psychrophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rhodospirillum rubrum* y *Anabaena variabilis*. (López-López, 2012). La presencia de un número elevado de bacterias mesófilas aerobias que crecen bien en un rango de 20 a 45°C, significa que puede haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos de origen humano o animal (Prescott *et al.*, 2002).

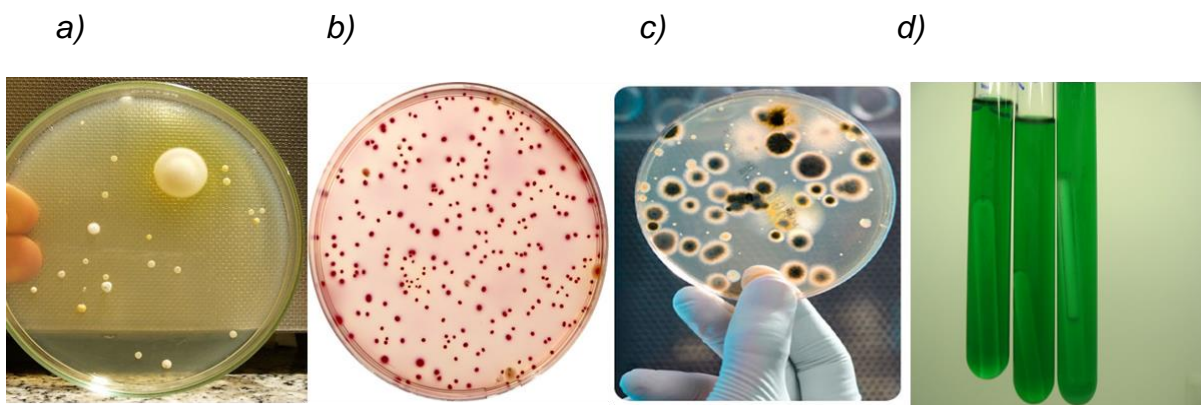


Figura 2. Microorganismos Indicadores. a) Bacterias Mesófilas Aerobias, b) Coliformes Totales, c) Mohos y Levaduras d) Coliformes Fecales.

Otro grupo son los coliformes totales (CT) este tipo de bacterias se caracteriza por su forma de bacilos, anaerobios facultativos, Gram negativos, no formadores de esporas e indicador de contaminación microbiana (Universidad de Salamanca), pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, lactosa-positivas con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C. (Fig.2 b). Los géneros más prominentes del grupo CT son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klesiella*.

Particularmente los coliformes fecales (CF) son microorganismos fermentadores de la lactosa y se multiplican a una temperatura de 44.5°C. (NSO 13.07.01.08, 2009) (Fig. 2 c). Los CF son considerados más resistentes al ambiente, provenientes de contaminantes fecales de humanos y animales de sangre

caliente. *E. coli* la típica bacteria intestinal en el hombre y animales de sangre caliente. En vegetales crudos su presencia es sugestiva de contaminación fecal reciente.

Por último se menciona el grupo indicador de hongos y levaduras; estos microorganismos crecen más lentamente que las bacterias en alimentos no ácidos que conservan humedad. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de alta actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y jugos, vegetales y, productos derivados de los cereales, así como en los alimentos congelados y en deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas (Toro y Bazo, 2008). (Fig. 2 d)

Específicamente Odoux y Grisoni, (2011) mencionan que los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* producen micotoxinas y se han encontrado en vainilla. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos bajo condiciones específicas fisiológicas (crecimiento microbiano) y ambientales (pH, temperatura, aw, preservación). La toxicidad fúngica puede ser eliminada durante el proceso de beneficiado, mientras que las micotoxinas permanecen en el alimento.

2.2 MICROBIOTA PRESENTE EN LA VAINA DE VAINILLA

Principalmente la microbiota que se presenta en la vainilla son un gran número de bacterias patógenas, la bacteria más común determinada en vainas de vainilla son bacilos termófilos.

Roling *et al.*, (2001) demostraron que las comunidades microbianas más abundantes son bacilos termófilos y termotolerantes, como por ejemplo *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, y *B. smithii* desarrollados en altas temperaturas (hasta 65 °C) estos microorganismos se mantuvieron durante más de una semana después de escaldar las vainas de vainilla.

Yang y Li, (2008) informaron que la bacteria *Enterobacter sp* encontrada en las raíces de la planta de vainilla que tienen la capacidad de utilizar el ácido ferúlico como única fuente de carbono. Estos metabolitos primarios que utilizan ácido ferúlico como única fuente de carbono incluyen 4-vinilguayacol, así como otros productos químicos relacionados, todos los cuales comparten el mismo guayacol-carbono. Sobre la base de los análisis estructurales de compuestos no volátiles en el filtrado del cultivo de esta cepa, se aislaron e identificaron dos nuevos metabolitos putativos. Estos resultados permitieron proponer la posible ruta metabólica que conduce de ácido ferúlico a la 4 vinilguayacol. Estos experimentos proponen por primera vez el metabolismo del ácido ferúlico a través de la descarboxilación para producir 4-vinilguayacol y una conversión adicional a la vainillina en *Enterobacter sp*.

Se han reportado pruebas a vainas de vainilla francesa, logrando identificar un gran grupo de bacterias que pueden ser un gran riesgo para los consumidores con sistemas inmunológicos debilitados. La prueba encontró la presencia de especies de *Klebsiella (K. oxytoca)*, *Citrobacter braakii*, grupo *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, las especies de *Acinetobacter (A. baumannii y A. haemolyticus)* y *Leclercia adecarboxylata*. Aunque ninguna de estas bacterias presentan un riesgo, excepto *Cronobacter sakazakii*, es importante para los consumidores sanos que, *K. oxytoca* representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores con sistemas inmunológicos debilitados por enfermedades graves (GDC, 2013).

Por otro lado los mohos encontrados con más frecuencia son *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* y *Colletotrichum* que afecta a los brotes, hojas y frutos. Los mohos antes mencionados pueden producir manchas de color café irregulares y hendiduras afectando significativamente el tejido (Sánchez-Torres, 2007).

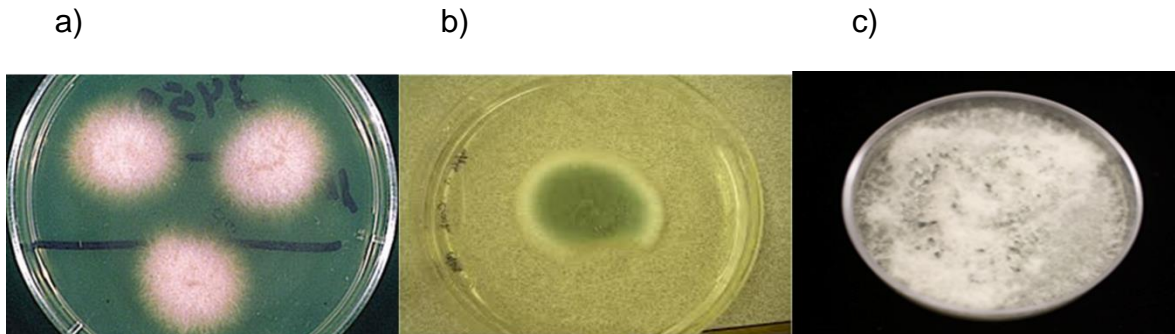


Figura 3. Hongos que se pueden encontrar en la vainilla. a) *Fusarium oxysporum*, b) *Penicillium*, c) *Colletotrichum vanillae*. (Sánchez-Torres, 2007).

Particularmente Odoux y Grisoni, (2011) reporta que los tratamientos de curado de vainilla a 30°C y 55°C reducen los recuentos de hongos y levaduras presentes en la vainilla. Sin embargo existen reportes en los cuales aíslan con mayor frecuencia a los mohos *Fusarium* y *Colletotrichum*, particularmente Narawan (1990) informa que *Fusarium oxysporum* es el causante de la pudrición del tallo de la vainilla por lo que este microorganismo es patógeno para *Vanilla planifolia*. Mientras que Sasikumar, (1992) reporta que la mayoría de las enfermedades graves de las plantas de vainilla son producidas por *Fusarium oxysporum* y *F. vanillae*. El agente patógeno de la podredumbre del tallo de la vainilla aislada de diversas zonas de Indonesia fue identificado como *Fusarium oxysporum* (Tombe *et. al*, 1992).

De igual manera Thomas (2003) también reporta otro tipo de moho *Colletotrichum* que es la causa de que la hoja sufra putrefacción y manchas asociadas a la pudrición, visto por primera vez en vainilla *planifolia* de la India.

Suseela Bhai *et al.* (2003) también nos menciona que el hongo aislado e identificado asociado a una prematura caída de vainas y coloración amarillenta en vainas de vainilla es *Colletotrichum* siendo este moho un peligro para la *Vanilla planifolia*.

Thomas y Suseela Bhai, (2000) después de determinar *Fusarium* y *Colletotrichum* encontraron un nuevo tipo de pudrición en vainilla que afecta a las vainas de vainilla, se observó en la vainilla (*Vanilla planifolia*) creciendo en las regiones de distrito Moovatupuzha Kerala, una enfermedad que pudre más rápido que los

mohos ya antes mencionados. La enfermedad se caracteriza por podredumbre en racimos de vaina y posteriormente el desarrollo de una gruesa capa de moho sobre la superficie de la vaina. El organismo causal fue identificado como *Sclerotium rolfsii* que es una de las infecciones más graves encontradas.

Otro moho encontrado similar a *Sclerotium rolfsii* se determinó en plantaciones experimentales de Lucknow durante tiempo de lluvias en los meses de julio a septiembre de 1990 y 1991. Los síntomas incluyen manchas en las hojas empapadas, que aumentaron rápidamente de tamaño y se convierten en tono marrón claro y necrótico. El microorganismo fue aislado a partir de hojas infectadas en agar de papa dextrosa y lograron identificarlo (Shukla *et al.*, 1993).

CAPITULO 3 PROCESO DE BENEFICIADO

Los totonacas beneficiaban a la vainilla exponiéndola al sol en el patio de sus casas y sudándolas alternadamente; a este método se le llamo “curado al sol”. En la actualidad, el beneficiado es un proceso de conservación del fruto, donde implica una serie de pasos previos a la obtención del producto beneficiado o finalizado, esta actividad es la más importante desde el punto de vista de comercialización, ya que es donde se le da el valor agregado a la vainilla. Obteniendo valores por arriba del 1:10, en relación con el precio de venta de vainilla verde y vainilla beneficiada respectivamente (Reyes-López, 2008).

El objetivo del beneficiado es detener el proceso natural de madurez fisiológica de las vainas, y acelerar los cambios que llevarán en la formación de los constituyentes del sabor y aroma de la vaina. Existen más de 170 compuestos volátiles identificados en la vaina (vainillina, ácido vainillínico, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-cresol, 2-fenilalcohol, anisaldehído, guayacol, fenil-acetaldehído, diacetilo, eugenol, metilcinamato, entre otros) (Reyes-López, 2008). Según (Curti, 1990) el beneficiado de la vainilla, es un proceso de fermentación mediante el cual el fruto verde sin aroma cambia a un color achocolatado brillante y adquiere olor suave y delicado. El cambio se debe a una serie de reacciones químicas enzimáticas que inducen la formación de vainillina y otros compuestos aromáticos y saborizantes a partir de sustancias precursoras que existen en el fruto maduro. El proceso de beneficiado se requiere debido a que durante la cosecha los frutos de vainilla no contienen los elementos que le dan su aroma característico, sino que los obtiene durante el proceso de curado, durante la evaporación de líquidos presentes en el fruto y por la acción enzimática que sufren los glucósidos, se producen principalmente vainillina de 0.5 a 3.4%, ácido vainillínico y resinas suaves en 2%, proteínas, azúcares, celulosa y minerales. Estos compuestos se conjugan para dar el aroma natural a la vainilla, permitiendo distinguirla fácilmente de la vainilla sintética (Herrera-Cabrera *et al*, 2008).

3.1 ETAPAS DEL BENEFICIADO

Para realizar el beneficiado de vainilla las actividades a ejecutar son: recepción, despezonado, clasificación, matado del fruto, enmaletado, asoleado y sudado, clasificación, depósito y empaque (Reyes-López, 2008). A continuación se describen cada una de las etapas de beneficiado rustico y tradicional. (Fig. 4 y 5)



Figura 4. Etapas de beneficiado. a) Recepción, b) Despezonado, c) Clasificación, d) Matado, e) Sudado (Curti, 1990).



Figura 5. Etapas de beneficiado. a) Tendido, b) Reposo, c) Clasificación, d) empaquetado (Reyes-López, 2008).

Recepción

La recepción es la actividad de recibir, seleccionar y cuantificar el producto según su calidad, esto con la finalidad de determinar el valor total de dicho producto. Que consiste en recibir las vainas de color verde uniforme y textura suave sin rajaduras, que debe contar desde la polinización con una madurez fisiológica de 9 meses (NMX-FF-074-SCFI-2009).

Despezonado

El despezonado es la separación de los frutos y el raquis, que es la parte del racimo que se conoce regionalmente como “pezón”. Reyes-López (2008) define al despezonado como el desprendimiento del fruto y del raquis, oprimiendo el ápice.

Primera clasificación

Para poder obtener vainas de primera calidad debe contar con un tamaño de más de 12 cm y enteras sin rajaduras o lastimaduras (Curti, 1990).

Por lo que los frutos despezonados se clasifican de acuerdo a su condición física en tres clases, cuyas proporciones varían de acuerdo a la madurez del fruto, a las condiciones climáticas y al manejo durante su desarrollo.

Las tres clases son: vainilla entera, vainilla rajada y vainilla zacatillo.

Vainilla Entera.- Frutos grandes, maduros, bien formados y sin daños físicos, con un contenido de humedad de 78%, constituyen aproximadamente 85% del peso del racimo.

Vainilla Rajada.- Frutos sobre-maduros, abiertos longitudinalmente en forma natural, el extremo inferior se torna café y exuda un líquido rojizo, con un contenido de humedad de 75 a 77%, constituyen aproximadamente 4% del peso del racimo.

Vainilla Zacatillo.- Frutos inmaduros, pequeños, deformes y/o con daños de insectos o mecánicos, de menor calidad que la vainilla entera, con un contenido de humedad de 80% aproximadamente, esta vainilla representa 6% del peso del racimo. La vainilla zacatillo se convertirá en picadura al final del beneficiado (Curti, 1990).

Matado

El matado del fruto consiste en inhibición de la madurez fisiológica del fruto y evitar que estos se abran y demerite su calidad comercial. El matado de fruto se puede realizar con agua caliente, horno, nylon, exposición al sol, congelación o utilizando autoclaves en laboratorios.

El matado en agua caliente es una de las alternativas para detener la madurez fisiológica del fruto de manera rápida y eficiente, en comparación con los hornos que requieren de 48 horas para realizar esta actividad.

La metodología para el uso de agua es calentar en un cazo de número 90 a punto de hervor (70°C, 90°C o 100°C).

Se introducen las vainas de vainilla en arpillas de 15 a 20 kg y se sumergen en el agua caliente durante un tiempo recomendado por el maestro beneficiador, las vainas se tornan de color obscuro casi en su totalidad, las partes que quedan aún verdes se oscurecen durante el proceso de beneficiado (Reyes-López, 2008).

Para el uso del horno se cuenta en la parte inferior un túnel por donde penetra el calor y se distribuye dentro del mismo muro por medio de un serpentín; en la parte superior del horno se adapta un visor de vidrio y detrás de este se coloca un termómetro para medir la temperatura interna (Curti, 1990).

Al meter las maletas de vainas debe estar el horno a una temperatura de 40°C, al terminar se cierra y se sella para evitar pérdidas de calor, se aumenta la temperatura a 60°C y así permanece 36 horas, transcurrido el tiempo, se baja la temperatura a 40°C para descargar el horno (Curti, 1990).

El horneado tiene como finalidad matar las células del fruto para suspender el proceso de maduración, evitando así que se rajen, pero manteniendo la actividad enzimática necesaria para la fermentación, el sobrecocido destruye las enzimas disminuyendo el proceso de fermentación, por lo que el fruto beneficiado se torna rojizo y resulta de muy baja calidad (Curti, 1990).

Existe otro tipo de matado, en el cual se ocupa nylon para realizar el matado del fruto, con este método se requiere más espacio y es ideal para pequeños volúmenes. Consiste en extender un nylon, sobre él se colocan los frutos de vainilla de manera ordenada y se cubren con el mismo nylon evitando que se pierda el calor, a medida que se genere energía calorífica se incrementa la temperatura en el interior y de esta manera se hace la inhibición de la madurez fisiológica (Reyes-López, 2008).

La exposición al sol es otro método para matar las vainas de vainilla, que solo consiste en colocar las vainas en petates exponiéndolas a los rayos del sol manteniendo las vainas a una temperatura aproximada de 60°C durante 36 hr (CONAVAI, 2007).

La congelación se utiliza como método alternativo para matar las vainas de vainilla a una temperatura de -10°C durante 24 a 36 hr, método que solo es utilizado en laboratorios para matado de frutos (CONAVAI, 2007).

Sudado

El sudado es en general almacenar las vainas en cajones sin dejar escapar el calor interno para promover las reacciones enzimáticas (Curti, 1990). Esta etapa consiste en depositar lotes de diferentes clases en el mismo cajón sudador, estos se deben separar con un nylon o cobija de algodón. Los cajones sudadores son de madera, de longitud variable de acuerdo al volumen que normalmente maneje el productor. Para facilitar el depósito y acomodo de la vainilla, se recomienda una altura de 75 a 80 cm y 1.20 m de ancho. Una vez que se ha llenado el cajón, se tapa perfectamente con petates y cobijas para evitar que se pierda el calor, así

debe permanecer 24 horas; el sudado tiene como finalidad favorecer la fermentación y la deshidratación del fruto (Curti, 1990).

Tendido

Mantener oreadas las vainas para evitar infección por hongos o microorganismos patógenos y evitar el enmielado de las vainas (Reyes-López, 2008).

En días lluviosos, cuando no es posible asolear las vainas ni pueda mantenerse en los cajones sudadores, la vainilla se debe ventilar en camillas de madera que se colocan sobre estanteros o travesaños conocidos como espigueros. El lugar en donde se realiza esta operación debe ser seco y fresco para evitar infecciones por microorganismos patógenos, ahí permanecerá la vainilla mientras continúe lloviendo; si la lluvia se prolonga por muchos días, es recomendable hornearla y si los días son nublados se saca la vainilla a los tendales únicamente para orearla (Curti, 1990).

Reposo

Mantener reposando las vainas a temperatura ambiente para su mejor desarrollo aromático y sabor, verificando que el beneficiado sea correcto y evitar enfermedades patógenas (Reyes-López, 2008).

Segunda Clasificación

Cuando las primeras vainas se clasifican, este proceso se realiza en tres clases: entreseca, blanda y cruda. La entreseca corresponde a los frutos cuyo contenido de humedad es adecuada para la conservación, por lo tanto, ya no se asolearan ni se sudaran; la blanda y la cruda se sigue trabajando hasta que adquieren las características de la entreseca (Curti, 1990).

Doce horas antes de que se cumplan las 48 horas de reposo se realiza una primera selección por tamaños formando lotes de primera, segunda y tercera calidad. Posteriormente se vuelven a tender las vainas al patio y se realizan dos sudados consecutivos; después se dejan reposar las vainas por otras 48 horas, en

las camillas y en las últimas 12 horas se realiza una selección de vainas para formar lotes de vainas de acuerdo con la clasificación de vainas crudas, blandas y entresecas (Reyes-López, 2008).

Empacado

El empacado debe llevar en el exterior una etiqueta o impresión permanente, con caracteres legibles e indelebles, con los siguientes datos:

Nombre del producto, nombre botánico y tipo de presentación, nombre comercial, marca o identificación simbólica del productor o envasador, nombre y dirección del beneficiador, distribuidor o exportador y cuando se requiera, el de importador, zona regional de producción y la leyenda del producto de México, fecha de cosecha y/o envasado, designación del producto y el contenido neto en kilogramos (Curti, 1990).

V. METODOLOGÍA

A continuación se menciona un diagrama general (Figura 6) de la metodología propuesta para esta investigación donde se incluyen las etapas que la conforman:

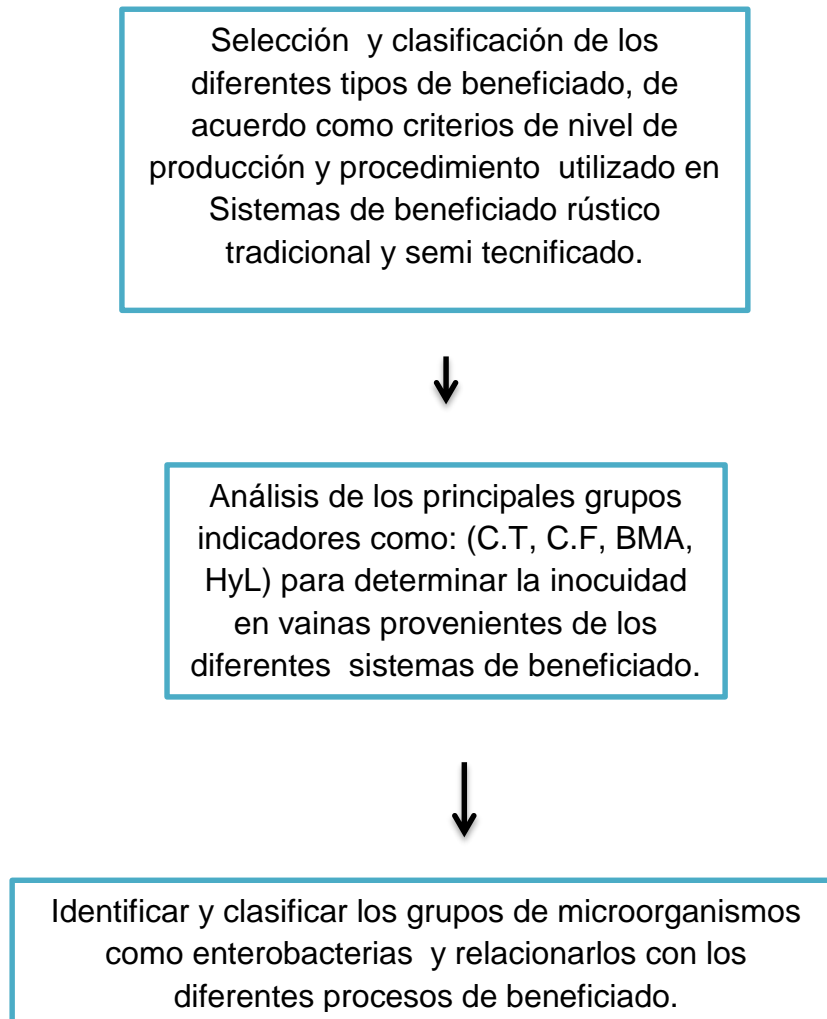


Figura 6. Diagrama general de la metodología.

5.1 IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE BENEFICIADO.

Para la selección y clasificación de los procesos de beneficiado se recabó información de campo mediante el uso de cuestionarios aplicados con los productores de las regiones de Pantepec, Puntilla Aldama, 1° de Mayo, Ayotoxco y 20 soles (Papantla), localizado en los estados de Puebla y Veracruz (Anexo 1). Con la información recabada se conocen los criterios de selección de los sistemas de producción considerando 1) nivel de producción, 2) procedimiento utilizado en las distintas etapas de beneficiado como son recepción, despezonado, primera clasificación, matado, sudado, tendido, reposo, segunda clasificación y empacado.

5.2 EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS INDICADORES EN VAINAS VERDES Y BENEFICIADAS.

Se analizaron los grupos indicadores en vainas de vainilla siguiendo las normas establecidas para la identificación de cada uno de los microorganismos indicadores. Los grupos indicadores que se determinaron fueron los siguientes: Coliformes Totales, Coliformes Fecales, Bacterias Mesófilas Aerobias, Hongos y Levaduras.

La determinación de los grupos indicadores se llevó a cabo mediante los procedimientos que nos marcan las normas establecidas, utilizando 25 g de vainas verdes o beneficiadas cortadas en piezas de 1 cm y sumergidas en 250 mL de peptona de caseína, durante 1 hr en agitación a 157 rpm.

Paralelamente se realizaron los recuentos de los mismos grupos indicadores con un previo enriquecimiento siguiendo el procedimiento propuesto anteriormente, utilizando caldo TSB en vez de peptona de caseína con algunas modificaciones de acuerdo con lo reportado por Roling *et al.*, (2001). Lo anterior con la finalidad de favorecer el aislamiento e identificación de la microbiota presente sobre la superficie de la vaina.

PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS

Para la realización de los recuentos de los microorganismos indicadores se llevaron a cabo diluciones seriadas de las muestras y se procedió con lo estipulado en la NOM 110-SSA-1-1994. Se consideró como dilución primaria 25 g de vaina en 250 mL de diluyente (Peptona de caseína o Caldo Soya Trypticaseina) y las muestras se homogenizaron. Posteriormente se continuó con las diluciones de las muestras con el mismo diluyente de acuerdo con el grupo indicador analizado.

RECUESTO DE GRUPOS INDICADORES

Los recuentos de los grupos indicadores se realizaron de acuerdo con las normas oficiales vigentes como se menciona en la Fig. 7

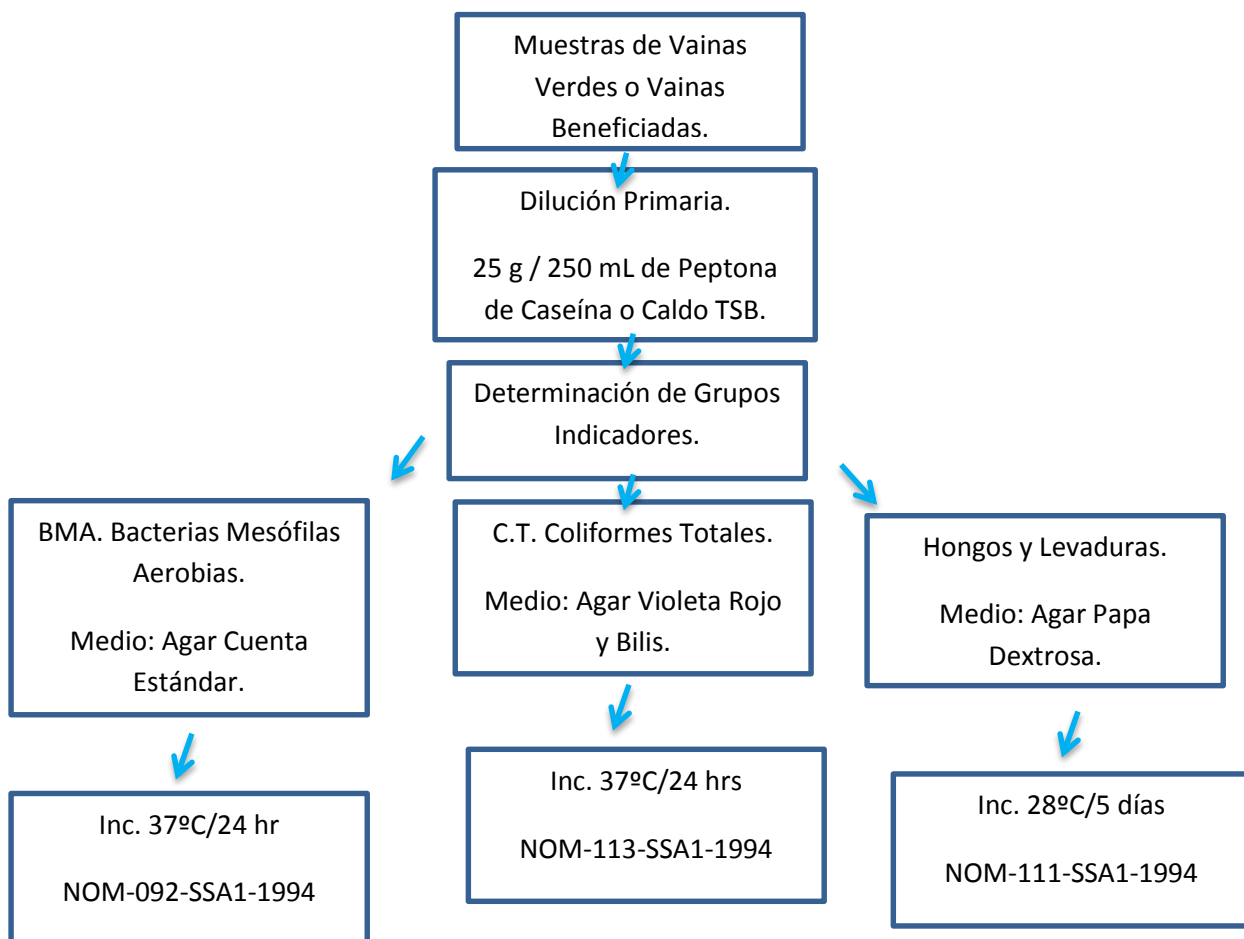


Figura 7. Diagrama de flujo para el recuento de microorganismos indicadores en vainas verdes y beneficiadas.

5.2.1 ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES

La determinación de los microorganismos coliformes totales se determinó utilizando los métodos de vertido en placa y Número más probable (NMP) conforme con las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-113-SSA1-1994 y NOM-112-SSA1-1994.

5.2.2 BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS

La determinación de los microorganismos bacterias mesófilas aerobias se llevó a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, la cual considera inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994. En cada dilución se, agregarán de 12 a 15 ml del medio Cuenta Estándar, se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Se Incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Todas las cajas se incubaron en posición invertida por 35°C a 48 h. En la lectura se seleccionaron aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC/g.

5.2.3 HONGOS Y LEVADURAS

La determinación de los microorganismos hongos y levaduras se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, el método utilizado fue vertido en placa el cual consiste en adicionar 1mL de cada dilución y posteriormente verter de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa, las condiciones de incubación consistieron en colocar los cultivos a 28°C, contando las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días.

5.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTERIAS

Para la identificación de las enterobacterias, se seleccionaron las morfologías coloniales de los medios Agar Rojo Bilis Cristal Violeta y Cuenta estándar y

medio Mac Conkey se realizaron pruebas bioquímicas básicas IMViC (Prueba de Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato), las cuales fueron confirmadas por el método VITEK que se basa en los porcentajes de probabilidades asociadas con la identificación bioquímica de un microorganismo (Galeón, 2011).

5.4 RELACIÓN DE LOS PROCESOS DE BENEFICIADO

Se identificaron los principales microorganismos indicadores de inocuidad analizados en vainas verdes y beneficiadas y se relacionaron con los distintos sistemas de beneficiado.

5.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

DEFINICIÓN Y DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE DIVERSIDAD

A continuación se muestran los índices de diversidad de Shannon, Simpson y Chao, utilizados en esta investigación.

Índice de Shannon o **índice de Shannon-Wiener**: se usa en ecología u otras ciencias similares para evaluar la biodiversidad. Este índice se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0 a 1 y no tiene límite superior o en todo caso lo da la base del logaritmo que se utilice (Pla, 2006).

La ecuación 1 define al índice de Shannon:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i \dots\dots\dots(\text{Eq. 1})$$

donde:

- S – número de especies (la riqueza de especies)
- p_i – proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie i): $\frac{n_i}{N}$

- n_i – número de individuos de la especie i
- N – número de todos los individuos de todas las especies

De esta forma, el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia)

Índice de diversidad de Simpson: (también conocido como el índice de la diversidad de las especies o índice de dominancia) es uno de los parámetros que nos permiten medir la riqueza de organismos. En ecología, es también usado para cuantificar la biodiversidad de un hábitat. Toma un determinado número de especies presentes en el hábitat y su abundancia relativa. El índice de Simpson representa la probabilidad de que dos individuos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie (Simpson, 1949).

La ecuación 2 define al índice de Simpson:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \dots\dots\dots(\text{Eq. 2})$$

Donde:

- S es el número de especies
- N es el total de organismos presentes (o unidades cuadradas)
- n es el número de ejemplares por especie

Índice de Chao: demuestra cuántas especies están representadas por solo un individuo en la muestra y cuántas especies están representadas por dos individuos. Escalante-Espinosa, (2003).

La ecuación 3 define al índice de Chao:

$$\text{Schao1} = \text{Sobs} + \frac{n_1^2}{n_2^2} \dots \dots \dots \text{(Eq. 3)}$$

Schao1= riqueza total de especies

Sobs= no. De especies observadas

n1= número de especies observadas i

n2= número de especies observadas dos veces

5.6 Análisis de experimento y Análisis estadístico

Se estableció un diseño experimental completamente al azar teniendo como fuentes de variación las vainas beneficiadas de cada una de las diferentes localidades (Pantepec, Puntilla Aldama, Ayotoxco, 1º de Mayo y 20 Soles) de donde se desarrollaron los análisis, el tipo de beneficiado (rustico, tradicional y semi tecnificado) y tipo de vainas (verde y beneficiada), considerando análisis de varianza (ANOVA) con un $\alpha=0.05$. Los resultados fueron evaluados con el paquete estadístico MiniTab (versión 17), teniendo como respuestas los recuentos realizados de los grupos indicadores obtenidos de los análisis microbiológicos.

la vainilla en verde ya que económicamente resulta más rentable, aunque cabe mencionar que también benefician sus vainas únicamente para comercializarlas como artesanías y extractos naturales, esto según lo reportado por el Comité Técnico Estatal de Evaluación de Puebla (2011). Asimismo según la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA, (2010) reporta que gran parte de las pérdidas postcosecha de vainilla en la región de Pantepec se deben a la presencia de plagas y enfermedades fungosas, éstas últimas ocasionadas por agentes como *Fusarium oxysporum* causante de pudrición en las raíces y tallos, propiciando la muerte de la planta y pérdida, del fruto.

B. Puntilla Aldama

El poblado de Puntilla Aldama fue la segunda localidad considerada en este estudio y se encuentra situada en el Municipio de San Rafael, Estado de Veracruz (Fig. 9). Puntilla Aldama se encuentra a 20 msnm y pertenece junto con la localidad de Papantla a la región del Totonacapan en el estado de Veracruz. Asimismo en esta región se encuentran concentrados 20 % de los productores de vainilla. Aunque debido a la humedad en la región los productores también sufren problemas con enfermedades fúngicas particularmente ocasionadas por el hongo *Colletotrichum* capaz de producir caída del fruto poco después de la polinización. Cabe mencionar que el productor de esta región aplica cal a los cultivos con la finalidad de erradicar o evitar la infección ocasionada por agentes fúngicos (CONAVAI, 2007).

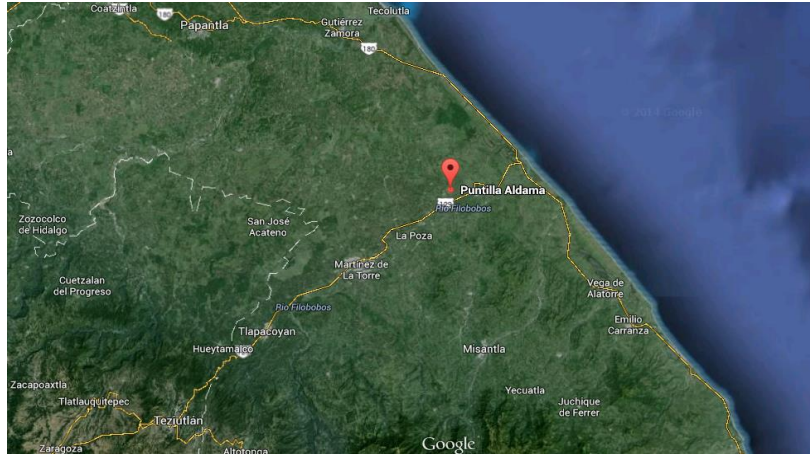


Figura. 9 Ubicación geográfica del poblado de Puntilla Aldama perteneciente al municipio de San Rafael estado de Veracruz.

C. Ayotoxco

La comunidad de Ayotoxco se encuentra ubicada en la zona de la Sierra Norte del estado de Puebla (Fig.10). Ayotoxco cuenta con 82 productores de vainilla y 0.92 hectáreas de cultivo por productor. Sin embargo la producción mencionada no es suficiente y normalmente los productores optan por la compra y acopio de vainilla verde para su posterior beneficio según lo mencionado en el Comité Técnico Estatal de Evaluación de Puebla (2011) y SAGARPA (2010).

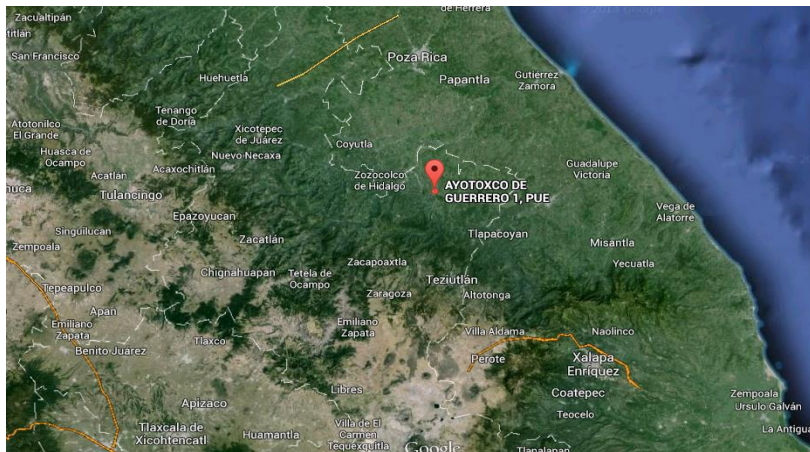


Figura. 10 Ubicación geográfica de la comunidad de Ayotoxco perteneciente al estado de Puebla.

D. Papantla.

El municipio de Papantla está situado al norte del estado de Veracruz, en esta localidad se ubican dos sitios de beneficio, el primero perteneciente a la comunidad Primera de Mayo y el segundo corresponde al rancho 20 Soles (Fig 11). Papantla cuenta con más de 55 productores de vainilla con un espacio de más de 1300 m² de cultivo de vainilla verde por productor, solo la mitad de lo cultivado se beneficia. La región de Papantla es óptima para el crecimiento de las plantas de vainilla ya que cuenta con un clima y suelo propicio para su cultivo. (Lugo-Castillo, 2012). Las condiciones especiales que requiere el cultivo de vainilla son una temperatura de 25°C, una humedad relativa de 75% y un contenido de agua de un 45% con buena ventilación, para que las vainas crezcan adecuadamente (INIFAP, 2010).

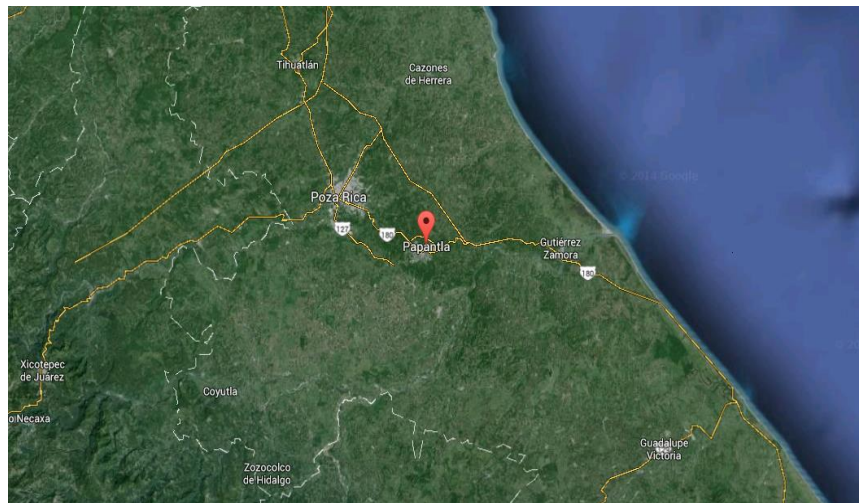


Figura. 11 Ubicación geográfica del municipio de Papantla perteneciente al estado de Veracruz.

Las vainas de vainilla verde por lo general crecen en bosques (clima templado) a una temperatura aproximada de 30°C con precipitaciones de 500 a 2000 mm, donde parece ser también tolerante a climas más cálidos, con temperatura un poco mayor a los 34°C (Gómez-López, 2012). Por lo tanto son condiciones adecuadas para las bacterias mesófilas, cuya temperatura óptima es de 30 a 45°C (SENASA, 2004).

6.2 CLASIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES PROCESOS DE BENEFICIADO

Para realizar la clasificación de los diferentes procesos de beneficiado se realizaron cinco entrevistas con los productores, aplicando cuestionarios y en cuyos reactivos se incluyó información sobre las siguientes etapas: recepción, despezonado, primera clasificación, matado, sudado, tendido, reposo, segunda clasificación y empaque de las vainas beneficiadas (Fig 12a-12d). Con información recabada se propuso clasificar a los procesos de beneficios como: rústico, tradicional y semi tecnificado (Tabla 4 y 5).



Figura 12. Proceso de beneficiado rústico. a) Recepción, b) área de matado y tendido, c) reposo, d) 2º clasificación, e) empackado.

Los sistemas de beneficio tipo rústico consideran nueve etapas: recepción, despezonado, primera clasificación, matado, sudado, tendido, reposo, segunda clasificación y por último empackado.

En la etapa de recepción los productores de la región de Pantepec y Ayotoxco reciben sus vainas con una textura rígida, un color amarillento en las puntas y una diferencia de 2 cm de longitud entre vainas, así como lo describe Curti (1990). En relación con la longitud de las vainas, los tres sistemas de beneficiado optan por considerar tres tamaños que oscilan entre 12 y 20 cm según la calidad de los frutos.

Otro parámetro importante para la recepción es la coloración inicial que deben presentar las vainas, particularmente los productores seleccionan vainas con puntas amarillas y el beneficio de la región de Puntilla Aldama espera 9 meses desde la polinización como lo indica la NMX-FF-074-SCFI-2009.

Tabla 4: Etapas y condiciones que se consideran en los sistemas de beneficiado rústicos.

Etapas del Beneficiado	Beneficiado Rustico 1	Beneficiado Rustico 2	Beneficiado Rustico 3
	Pantepec	Puntilla Aldama	Ayotoxco
Recepción	Textura Rígida, Amarillento en las puntas Longitud = 18 a 20 cm para 1º calidad, 15 a 17 para 2º calidad y 12 a 14 de 3º calidad	Esperar 9 meses Aspecto y Color poco amarillo Longitud = 14 a 16 cm para 1º calidad, 12 a 13 cm de 2º calidad y menores de 12 cm de 3º calidad o zacatillo	Textura Rígida, Amarillento en las puntas Longitud = 20 a 22 cm para 1º calidad, 18 a 19 cm para 2º calidad, 15 a 17 cm para 3º calidad y menores de 15 cm zacatillo
Despezonado	Retirar la vaina del raquis hacia atrás	Retirar la vaina del raquis hacia atrás	Retirar la vaina del raquis hacia atrás
Primera Clasificación	3 Categorías, 1º, 2º y 3º calidad incluyendo Pinta Rajada	3 Categorías, 1º, 2º y 3º calidad incluyendo Zacatillo	3 Categorías, 1º, 2º y 3º calidad incluyendo Zacatillo
Matado	Exposición al sol aprox. 50°C	Exposición al sol aprox. 50°C	Exposición al sol aprox. 45°C
Sudado	Cajones de madera a 50°C durante 24 hr	Cajones de madera a 60°C durante 24 hr	Cajones de madera envuelto con petate y cobijas a 50°C durante 36 hr
Tendido	Se utiliza T 50°C durante 4 hr dependiendo el día	Se utiliza T 60°C durante 2-3 hr dependiendo el día	Se utiliza T 45°C durante 3 hr dependiendo el día
Reposo	Utilizado para enfriar vainas durante 2 días	Utilizado para enfriar vainas durante 3-4 días	Utilizado para dar una mejor calidad en las vainas durante 30 días, revisando las vainas cada 2 días.
Segunda Clasificación	4 Categorías, con flexibilidad, 25% de H y de color café oscuro	3 Categorías, 2 tamaños y rajada con flexibilidad, 20-25% de H y de color café oscuro	3 Categorías y Zacatillo con flexibilidad, vainas de 22 cm, brillantes, 35% de H y de color café oscuro
Empacado	Bolsas de polietileno	Bolsas al Vacío	Bolsas de polietileno

En la etapa del despezonado la mayoría de los productores desprenden las vainas del raquis realizando movimientos suaves hacia atrás (Reyes-López, 2008). Excepto el productor de Ayotoxco debido que principalmente compra las vainas despezonadas. Una vez despezonadas las vainas son clasificadas en tres categorías y vainas tipo zacatillo, únicamente el beneficiado de la región de Pantepec considera la categoría de vainas pinta rajada como se demuestra en la Tabla 4, esta última clasificación concuerda con los criterios reportados por CONAVAI, 2007.

Una de las etapas más importantes del beneficiado de la vainilla es el “*matado*” que consiste en inhibir la madurez fisiológica del fruto (Reyes-López, 2008). Existen diferentes tipos de matado como el que se realiza con agua caliente usando temperaturas de 70°C, 90°C o 100°C Reyes-López, (2008). Otro tipo de matado es el horneado tiene como finalidad matar las células del fruto para suspender el proceso de maduración, evitando así que se rajen las vainas, pero manteniendo la actividad enzimática necesaria para la fermentación (Curti, 1990). De acuerdo con Reyes-López, (2008). Otra alternativa del matado, es ocupando nylon y sobre el cual se colocan los frutos de vainilla de manera ordenada y se cubren con el mismo material evitando que se pierda el calor.

En esta investigación la etapa del matado fue un punto crítico ya que esta etapa define la carga de bacterias coliformes, teniendo en cuenta los análisis microbiológicos en vainas beneficiadas que muestran una disminución significativa en este grupo indicador, ya que se cuenta con un rango de temperatura de 60 a 100°C, matando a las enterobacterias presentes.

En la Tabla 4 se presentan las condiciones del matado en los beneficiados tipo rústico, el cual consiste en exponer las vainas al sol en un rango de temperatura aproximadamente de 45 a 50°C, estas condiciones coinciden con lo reportado por Reyes-López, 2008.

En la etapa del sudado las vainas son colocadas en cajones de madera y se mantienen a una temperatura aproximada de 50 a 60°C durante 24 o 36 horas

cubiertas con petates y cobijas como lo realiza el productor de Ayotoxco, después de sudar las vainas se tienden en patios de gran longitud durante 2 y 4 horas aproximadamente a 50°C, dependiendo de las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa (INIFAP, 2010).

Posterior a la etapa del sudado las vainas se requieren dejar reposar durante 45 y 48 horas con la finalidad de enfriar las vainas y evitar así que los frutos permanezcan húmedos favoreciendo el crecimiento fúngico (Curti, 1990 y Reyes-López, 2008).

Por otra parte con la información recabada en los cuestionarios, los sistemas de beneficio rústico pertenecientes a las localidades Pantepec y Puntilla Aldama, se observó que las vainas requieren reposar de 2 a 3 semanas, mientras que los beneficiadores de la comunidad de Ayotoxco, las vainas permanecen en reposo durante 30 días con revisiones cada 2 días. Durante el beneficio es importante realizar una segunda clasificación, para la cual los productores de Puntilla Aldama y Ayotoxco separan sus vainas en 3 distintas categorías, de acuerdo con el nivel de flexibilidad y el porcentaje de humedad (25 y 35%). Cabe mencionar que los parámetros de flexibilidad y contenido de humedad son evaluados por los productores de acuerdo con el conocimiento tradicional. Particularmente para la comunidad de Ayotoxco también se revisa la coloración uniforme de las vainas hasta alcanzar un color café oscuro achocolatado, conforme a lo requerido por en la NMX-FF-074-CFI-2009. A diferencia de las 2 regiones antes mencionadas la comunidad de Pantepec considera 4 categorías distintas en relación con el aspecto de las vainas y el porcentaje de humedad del 25%.

Por último las vainas para su conservación son empacadas en bolsas de polietileno o en bolsas al vacío y almacenadas en cajones de madera.

En la Tabla 5 se describen los sistemas de beneficio considerados como tradicional y semi tecnificados ubicados en la región Primero de Mayo y el rancho 20 Soles. Las etapas de los procesos beneficio tradicional y semi tecnificado también consisten en nueve etapas: recepción, despezonado, primera

clasificación, matado, sudado, tendido, reposo, segunda clasificación y empacado. La principal diferencia se presenta en las condiciones de la etapa del matado, específicamente en la localidad de Primero de Mayo consiste en sumergir las vainas en agua en ebullición (100°C) durante un segundo y 20 Soles utiliza una temperatura entre 80 y 85°C durante 10 segundos, éstas últimas corresponden a las condiciones reportadas como idóneas según por Curti, (1990).

Otra diferencia reportada por los productores de los sistemas semi tecnificados corresponde a la etapa de sudado, misma que se lleva a cabo en cajones de madera o de plástico como el beneficiador del rancho 20 Soles quien expone las vainas a temperaturas entre 50 y 55°C por 48 h, en comparación con el beneficiador de Primero de Mayo cuyas condiciones corresponden a una temperatura de 45°C durante 12 horas aproximadamente.

De igual manera se encontraron diferencias en etapa de la segunda clasificación donde los dos productores seleccionan sus vainas de acuerdo con el porcentaje de humedad y flexibilidad. Particularmente el productor de Primero de Mayo también considera tres distintas categorías y una cuarta que incluye a las vainas rajadas de la misma forma como se clasifican los frutos en los sistemas rústicos.

El sistema de beneficiado más eficiente es el semi tecnificado, ya que sus etapas aportan mucho para que las vainas de vainilla tengan calidad en aroma sabor y lo más importante calidad microbiana.

Tabla 5: Etapas y condiciones que se consideran en los sistemas de beneficiado tradicional y semi tecnificado.

Etapa del Beneficiado	Beneficiado Tradicional 1º de Mayo	Beneficiado Semi-Tecnificado 20 Soles
Recepción	Esperar 9 meses Aspecto, Textura Rígida y Longitud = 20 a 18 cm para 1º calidad, 17 a 15 para 2º calidad y 14 a 12 de 3º calidad	Color Verde o Amarillento Longitud = 18 a 16 cm para 1º calidad, 15 a 12 cm para 2º calidad
Despezonado	Retirar la vaina del raquis con un movimiento hacia atrás	Retirar la vaina del raquis
Primera Clasificación	3 Categorías, 1º, 2º y 3º calidad incluyendo Rajada	2 Categorías, 1º y 2º calidad, separando por tamaño y grosor
Matado	Inmersión en agua caliente a 100°C/1-2s	Inmersión en agua caliente a 80-85°C/10s
Sudado	Cajones de madera a 45°C durante 12 hr	Cajones de madera o plástico a 50-55°C durante 48 hr
Tendido	Se utiliza T 45°C durante 3 hr dependiendo el día	Se utiliza T 60°C durante 2 hr
Reposo	Utilizado para enfriar vainas durante 3 días	Utilizado para enfriar vainas durante 30 días con 2 o 3 revisiones
Segunda Clasificación	3 Categorías y Rajada con flexibilidad, gran brillantes, 25% de H y de color café oscuro	3 Categorías con flexibilidad, gran brillantes, 27% de H, color café oscuro y con 16-17.9 de vainillina
Empacado	Bolsas de polietileno y después en cajones de cedro	Bolsas de polietileno y al vacío

6.3 ANALISIS MICROBIOLÓGICOS EN VAINAS VERDES Y BENEFICIADAS

Una vez obtenida la información acerca de los procesos de beneficiado se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes a los grupos indicadores de inocuidad: Bacterias mesófilas aerobias (BMA), Coliformes totales (CT), Hongos y levaduras (H y L) en vainas verdes y beneficiadas. Asimismo se realizaron los análisis correspondientes para la identificación de la microbiota aislada en vainas provenientes de las de diferentes localidades y tipo de beneficiado.

Tabla 6: Especificaciones microbiológicas para la vainilla.

Especificación	Método de prueba	Límite permitido
Bacterias mesofílicas aerobias UFC/g	NOM-092-SSA1-1994	100 UFC/g máximo
Hongos y levaduras UFC/g	NOM-111-SSA1-1994	10 UFC/g máximo
Coliformes totales en placa UFC/g	NOM-115-SSA1-1994	negativo

NMX-FF-074-SCFI-2009.

Análisis microbiológico en vainas verdes

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos en vainas verdes se presentan en la Tabla 7; específicamente las localidades 1 (Pantepec) y 4 (1º de Mayo), presentaron los recuentos más altos en BMA's con valores de 5.46 Log₁₀ y 4.79 Log₁₀ UFC/g respectivamente, compartiendo las mismas condiciones climáticas. Específicamente las BMA's son microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 45°C y dependen del oxígeno atmosférico para su crecimiento (Prescott *et al.*, 2002).

En cuanto a las (CT) las regiones 2 (Puntilla Aldama), 4 (1º de Mayo) y 5 (20 Soles) mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre sus recuentos con valores de 4.69 y 3.60 log₁₀ UFC/g.

De acuerdo con lo reportado por López-López (2012) el grupo indicador coliforme corresponde a las bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella*

miembros de la familia *Enterobacteriae*, mismos que se definen como bacterias anaeróbicas facultativas, Gram negativas, no esporulantes, con forma de bacilos, fermentadoras de lactosa con formación de gas en 48 horas a 35°C. Específicamente en el estudio entre los coliformes que se lograron aislar la especie de *Escherichia coli* con mayor frecuencia en el rancho 20 soles. Cabe mencionar que el aislamiento de *E. coli* podría asociarse con la falta de inocuidad, provocando enfermedades entéricas (Molina-López, 2014). Los géneros bacterianos mencionados se encuentran en su mayoría en suelos cálidos y húmedos, aproximadamente a una temperatura de 35°C, de ahí los índices de diversidad en vainas verdes varían conforme a los índices de vainas beneficiadas.

En relación con Odoux y Grisoni (2011) mencionan que los principales mohos aislados en vainilla son los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales son productores de micotoxinas. En esta investigación los recuentos de hongos y levaduras presentaron valores entre 3.38 y 5.29 Log₁₀, UFC, (Tabla 7), siendo las localidades 3 (Ayotoxco) y 4 (1º de Mayo) las que mostraron los recuentos más altos con 5.29 y 5.23 Log₁₀, UFC respectivamente. La región 2 (Puntilla Aldama) presentó diferencia significativa en comparación con las demás localidades con valores de 3.38 Log₁₀, UFC este comportamiento podría explicarse con la información recabada con el productor y beneficiador, quien menciona dentro de las medidas preventivas para evitar el crecimiento fúngico en las vainas, ellos aplican cal hidra en sus cultivos.

Tabla 7: Grupos indicadores (Log₁₀ UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas verdes provenientes de diferentes localidades.

Localidad	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	Bacterias Mesófilas Aerobias	Coliformes Totales	Hongos y Levaduras
1	5.46±0.04 ^a	4.69±0.03 ^a	4.33±0.07 ^b
2	3.40±0.10 ^c	4.69±0.03 ^a	3.38±0.23 ^c
3	3.30±0.09 ^c	4.69±0.03 ^a	5.29±0.02 ^a
4	4.79±0.08 ^b	4.69±0.03 ^a	5.23±0.04 ^a
5	3.32±0.14 ^c	3.60±0.01 ^b	4.63±0.30 ^b

Donde 1) corresponde a la localidad de Pantepec, 2) Puntilla Aldama, 3) Ayotoxco, 4) 1º de Mayo y 5) 20 Soles. Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí (P≥0.05) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados con los indicadores de inocuidad BMA; CT y H y L considerando como adecuación en la NOM 074 para análisis microbiológicos en vainilla, la etapa de enriquecimiento previa al recuento. Utilizando caldo soya tripticaseína, con la finalidad de incrementar la diversidad de la microbiota aislada.

En relación con los recuentos microbianos de las BMA y CT fueron las localidades 3 (Ayotoxco) y 5 (20 Soles) las que presentaron los recuentos más bajos con un valores de 3.54 y 3.41 Log₁₀ UFC/g y 3.37, 3.34, respectivamente (Tabla 8). Mientras tanto, las vainas de la localidad 5 (20 Soles) junto con las muestreadas en la localidad 4 (1º de Mayo) presentaron los recuentos más altos en los H y L, ambas localidades pertenecientes a los sistemas de beneficiado semi tecnificado.

Tabla 8: Grupos indicadores (Log₁₀ UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas verdes provenientes de diferentes localidades considerando la etapa de enriquecimiento en caldo soya tripticaseína.

Localidad	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	Bacterias Mesófilas Aerobias	Coliformes Totales	Hongos y Levaduras
1	5.14±0.03 ^a	4.65±0.004 ^a	4.38±0.01 ^b
2	3.81±0.01 ^c	3.66±0.04 ^b	4.01±0.10 ^c
3	3.41±0.13 ^d	3.37±0.09 ^c	4.17±0.05 ^b
4	4.95±0.01 ^b	4.61±0.008 ^a	5.19±0.05 ^a
5	3.54±0.10 ^d	3.34±0.04 ^c	5.08±0.05 ^a

Donde 1) corresponde a la localidad de Pantepec, 2) Puntilla Aldama, 3) Ayotoxco, 4) 1º de Mayo y 5) 20 Soles. Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí (P≥0.05) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Según con la Tabla anterior el grupo que incremento más los recuentos con enriquecimiento fueron el grupo de H y L aumentando un logaritmo, en las regiones 2 (Puntilla Aldama) y 5 (20 Soles) con valores de 4.01 y 5.08 Log₁₀ UFC/g.

En la figura 13 se presentan todos géneros bacterianos aislados en vainas verdes en las distintas localidades, entre los que se aislaron con mayor frecuencia se encontraron *Enterobacter* y *Klebsiella*, mismos que podrían ser considerados como parte de la microbiota nativa de las vainas de vainilla, Asimismo estos géneros son considerados del grupo coliforme (Guentzel, 1996).

Según con Flores-Torres, (2004) las condiciones óptimas de crecimiento de *Enterobacter cloacae* corresponden a una temperatura de 37°C y un intervalo de pH de 5 a 7. Las condiciones ambientales de temperatura pueden ser fácilmente alcanzables en las localidades consideradas en los muestreos de este estudio Mientras que con *Klebsiella* fue identificada con mayor frecuencia la especie *K. oxytoca*, considerada coco Gram negativa y de acuerdo con Dien y Cotta, (2003) es normalmente aislada a nivel intestinal y en forma natural en ambientes acuáticos ricos en nutrientes (Ainsworth, 2004). Esta bacteria se pudo aislar de

forma significativa posiblemente debido a su presencia en agua de riego o bien durante la aplicación de abono orgánico durante las etapas de producción. De igual manera fueron aislados otros géneros como *Raoutella ornithinolytica* y *Acinotobacter calcoaceticus*.

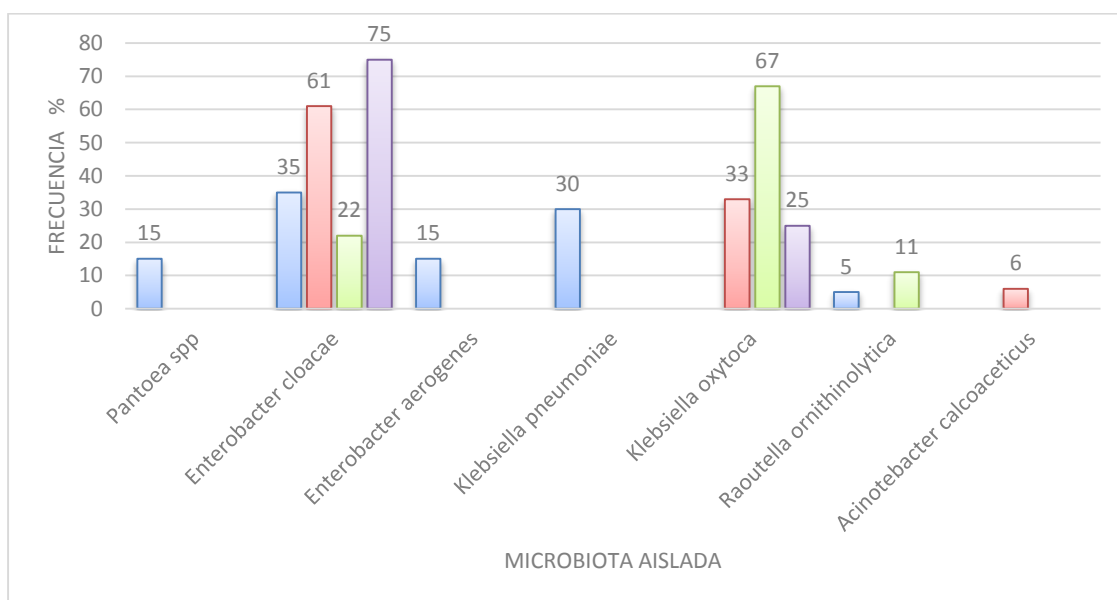


Figura 13. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas verdes. ■ Localidad de Pantepec, ■ Localidad de Ayotoxco, ■ Localidad 1º de Mayo, ■ Rancho 20 Soles.

A partir del aislamiento, identificación y confirmación de enterobacterias presentes en las vainas verdes se procedió a calcular los índices de diversidad (Tabla 9).

De acuerdo con Pla (2006) el índice de Shannon-Wiener (H') es utilizado para evaluar la biodiversidad, contemplando la riqueza de especies y su abundancia, sus valores pueden ir 0 a 1. Si el valor es 0 solo hay una especie en la muestra y si es mayor indica que hay más especies representadas por el mismo número de individuos. En este estudio la localidad de Pantepec es más abundante en el número de individuos con un valor de H' de 0.628, comparada con las otras localidades (Tabla 9).

Particularmente el índice de diversidad de Simpson (D) representa cuantos microorganismos de la misma especie hay dentro de un hábitat, por lo tanto el rancho de 20 soles con un valor de 0.5, su probabilidad de repetir la misma especie es mayor como se observa en la Tabla 9, porque solo se encuentran dos géneros bacterianos. Mientras que la localidad de Pantepec tiene un índice (D) más bajo con valor de 0.221, debido a que su diversidad de microorganismos es mayor y tiene menor probabilidad de repetir una especie elegida al azar.

El índice de Schao1 está basado en saber cuántas especies están representadas por solo un individuo en la muestra y cuantas especies por dos (Escalante-Espinosa, 2003). Este mismo autor sugiere que el estimador Schao1, depende de la abundancia de ciertas especies en la microbiota. En este estudio se pudo advertir una mayor abundancia de *E. cloacae* y *K. oxytoca*, en frutos de las cuatro localidades (Tabla 9 y Figura 13). Particularmente las localidades de Ayotoxco y Pantepec tienen una mayor abundancia en microorganismos como *E. cloacae*, con valores de Schao1 de 4.75 y 2.625 como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Índices de diversidad y microbiota presente en vainas verdes provenientes de diferentes localidades.

Localidad	Microorganismos	Índices de diversidad		
		H'	D	SCHAO1
Pantepec	<i>Pantoea spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Raoutella ornithinolytica</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	0.628	0.221	2.625
Ayotoxco	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Acinotobacter calcoaceticus</i>	0.359	0.457	4.75
1º de Mayo	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Raoutella ornithinolytica</i>	0.368	0.444	2.5
20 Soles (Rancho)	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	0.244	0.5	2.5

Los índices de diversidad en vainas verdes varían con respecto a los índices de vainas ya beneficiadas, posiblemente debido a que la mayoría de la microbiota presente en vainas verdes son nativas de la planta tomando como ejemplo *Pantoea spp* y *Enterobacter cloacae* que se encuentra en suelo cálido.

Análisis microbiológico de vainas beneficiadas

En la Tabla 10 presentan los resultados obtenidos de cada grupo indicador en vainas beneficiadas.

Tabla 10: Grupos indicadores (Log₁₀ UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de las diferentes localidades.

Localidad	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	BMA's	CT	H y L
1	5.11±0.05 ^a	<1	4.98±0.10 ^a
2	3.39±0.16 ^b	<1	2.00±0 ^d
3	2.87±0.02 ^c	<1	3.94±0.02 ^b
4	3.80±1.05 ^b	<1	3.00±0 ^c
5	3.64±0.04 ^b	<1	0±0 ^e

Donde 1) corresponde a la localidad de Pantepec, 2) Puntilla Aldama, 3) Ayotoxco, 4) 1º de Mayo y 5) 20 Soles. Valores permisibles: Bacterias Mesófilas Aerobias 100 UFC/g, Coliformes Totales en placa negativo, Hongos y Levaduras 10 UFC/g, S/C sin crecimiento, Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Los recuentos obtenidos en BMA, en vainas beneficiadas se encontraron en un intervalo de 3 a 5 Log₁₀ UFC/g, estos valores coinciden con los reportados por López-López, (2012) en su investigación cuyos recuentos en vainas beneficiadas provenientes de la localidad 1º de Mayo se encontraron con un intervalo de BMA de 1 a 4 Log₁₀ UFC/g.

Con estos resultados se concluye que los recuentos de BMA tendieron a permanecer constantes, comparando los valores de ambos estudios. Sin embargo de acuerdo con lo establecido en la norma mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009, tiene establecido como límites de 10 y 1000 (1 a 2 Log₁₀ UFC/g) en Bacterias Mesófilas Aerobias, lo cual nos indica que valores de las muestras analizadas fueron mayores a los indicados por la norma.

Asimismo los resultados obtenidos en BMA provenientes de vainas beneficiadas presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 10), siendo las vainas beneficiadas de la localidad 1 (Pantepec) las que mantuvieron los recuentos más altos (5.11 Log₁₀ UFC/g). Mientras que el resto de las vainas mostraron recuentos

aproximados entre 2 y 3 Log₁₀ UFC/g. En la localidad 3 (Ayotoxco), perteneciente al sistema de beneficiado rústico tuvo los recuentos más bajos comparado con la localidad 1 (Pantepec) y 2 (Puntilla Aldama) pertenecientes al mismo sistema de beneficiado.

En relación con las bacterias CT presentaron >10 UFC/g en vainas ya beneficiadas (Tabla 10). Dando cumplimiento a lo establecido por la norma mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009, aplicado a los tres sistemas de beneficiado. Sin embargo se requiere remarcar que si bien los recuentos de bacterias coliformes cumplen con la norma por que no presentaron crecimiento en las vainas analizadas, si fue posible aislar bacterias coliformes a partir de los recuentos realizados en placas de cuenta estándar en los análisis realizados de bacterias mesófilas aerobias, por lo tanto ningún grupo indicador en vainas beneficiadas provenientes de las diferentes localidades cumple con los límites permisibles establecidos con la norma.

En relación con los recuentos de H y L se encontraron en un intervalo de 2 a 5 Log₁₀ UFC/g, valores mayores a lo establecido por la norma, cuyo límite permisible corresponde a 10 (1 a 2 Log₁₀ UFC/g). Adicionalmente los valores obtenidos fueron mayores a los reportados por López-López, (2012) con valores de 1 a 2 Log₁₀ UFC/g, la diferencia entre los recuentos puede atribuirse a un incremento en los recuentos de las vainas verdes.

Adicionalmente los valores obtenidos en los hongos y levaduras presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 10) donde los recuentos más altos provinieron de vainas de la localidad 1 (Pantepec) con valores de 4.98 Log₁₀ UFC/g, Cabe mencionar que estos recuentos son similares a los analizados en vaina verde (Tabla 7), evidenciando que no se presentó una reducción significativa entre los dos tipos de vainas. Asimismo las vainas provenientes de las localidades 2 y 5 fueron las que mostraron los recuentos más bajos en hongos y levaduras provenientes de las localidades de Puntilla Aldama y el rancho 20 soles, beneficiadas con los sistemas rústicos y semi tecnificado.

Específicamente los recuentos más bajos se presentaron con los productores de las localidades 2 (Puntilla Aldama) y con el productor del rancho 20 soles, los recuentos pueden atribuirse a los valores bajos en vainas verdes (Tabla 7 y 8) y por el efecto del matado mediante escaldado (T 80-85°C) siendo el sistema de beneficiado semi tecnificado el más eficiente para reducir el crecimiento de forma significativa de los hongos y levaduras.

En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos en cada grupo indicador con la etapa enriquecimiento en vainas beneficiadas, previo a los análisis.

En las localidades 1 (Pantepec) y 3 (Ayotoxco) se obtuvieron los recuentos más altos de BMA, esta última localidad incrementó su recuento con la etapa de enriquecimiento con 2 Log UFC/g. Mientras que las regiones 2 (Puntilla Aldama) y 5 (20 Soles) fueron las más bajas en recuentos de bacterias mesófilas aerobias con valores de 3.15 y 3.17 Log₁₀ UFC/g. En relación con las bacterias coliformes los recuentos fueron similares a los obtenidos sin la etapa de enriquecimiento (Tabla 10 y 11). Finalmente con los hongos y levaduras los recuentos más bajos se determinaron en la localidad 2 (Puntilla Aldama) con un valor de 2.25 log₁₀, resultando muy similares los recuentos con la técnica de análisis con y sin enriquecimiento (Tabla 10 y 11).

Tabla 11: Grupos indicadores (Log_{10} UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de las diferentes localidades considerando la etapa de enriquecimiento en Soya Trypticaseína.

Localidad	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	Bacterias Mesófilas Aerobias	Coliformes Totales	Hongos y Levaduras
1	5.16±0.01 ^a	<1	4.85±0.01 ^a
2	3.17±0.18 ^c	<1	2.25±0.24 ^c
3	5.37±0.04 ^a	<1	3.31±0.01 ^b
4	4.46±0.007 ^b	<1	3.54±0.03 ^b
5	3.15±0.15 ^c	<1	4.18±0.07 ^a

Donde 1) corresponde a la localidad de Pantepec, 2) Puntilla Aldama, 3) Ayotoxco, 4) 1º de Mayo y 5) 20 Soles. Valores permisibles: Bacterias Mesófilas Aerobias 100 UFC/g, Coliformes Totales en placa negativo, Hongos y Levaduras 10 UFC/g, S/C sin crecimiento, Se reportan los valores promedio de Log_{10} UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

De acuerdo con los resultados obtenidos para analizar el efecto del tipo de beneficiado, en la Tabla 12, se puede observar que el beneficiado 1 (rústico) y 3 (semi tecnificado) no presentaron diferencias significativas en relación con el recuento de BMA, con recuentos mayores a los 3 Log_{10} UFC/g. Mientras que el beneficiado 2 (tradicional) alcanzó los recuentos más altos con un valor de 4.30 log_{10} UFC/g.

No existió relación con el tipo de matado entre el beneficiado 1 (rústico) y 3 (semi tecnificado), pero los recuentos fueron muy similares. Sin embargo el tipo de matado del beneficiado 3 (semi tecnificado) es considerado el más eficiente en cuanto al matado y reducción de la microbiota en la vaina. (Tabla 12)

Con los resultados obtenidos se pudo observar también que para reducir la carga microbiana, existen otras etapas como el sudado y tendido que también pueden repercutir sobre los recuentos finales.

Para el grupo de bacterias coliformes cabe mencionar que en la etapa de matado los recuentos son nulos en los distintos métodos, ya que las temperaturas que se alcanzan son mayor a los 50°C para todos los sistemas de beneficio (Tabla 12).

Tabla 12: Grupos indicadores (Log₁₀ UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de los diferentes sistemas de beneficiado.

Beneficiado	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	Bacterias Mesófilas	Coliformes	Hongos y Levaduras
	Aerobias	Totales	
1	3.92±1.01 ^b	<1	3.99±1.12 ^b
2	4.30±0.86 ^a	<1	4.11±1.22 ^a
3	3.48±0.20 ^b	<1	2.32±2.55 ^c

Donde 1) corresponde al sistema rustico, 2 al tradicional, 3 al semi tecnificado. Valores permisibles: Bacterias Mesófilas Aerobias 100 UFC/g, Coliformes Totales en placa negativo, Hongos y Levaduras 10 UFC/g, Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí (P≥0.05) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Los resultados evaluados por tipo de beneficiado utilizando medio de enriquecimiento se presentan en la Tabla 13 en la cual se muestra que el sistema 3 (semi tecnificado) presentó recuentos de bacterias mesofilas aerobias, mayores a los 3 Log₁₀ UFC/g mismos que fueron similares a los evaluados sin la etapa de enriquecimiento (Tabla 13). Mientras que con los organismos coliformes de igual manera fueron inhibidos durante la etapa de matado, los de hongos y levaduras presentaron diferencias significativas entre sí con recuentos entre 3 y 4 Log₁₀ UFC/g.

Tabla 13: Resultados de los grupos indicadores de inocuidad ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) obtenidos en vainas beneficiadas provenientes de los diferentes sistemas de beneficiado considerando la etapa de enriquecimiento en Soya Tripticaseína.

Beneficiado	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	BMA's	CT	H y L
1	4.57±1.05 ^a	<1	3.47±1.13 ^b
2	4.46±0.007 ^a	<1	3.54±0.03 ^b
3	3.15±0.15 ^b	<1	4.18±0.07 ^a

Donde 1) corresponde al sistema rustico, 2 al tradicional, 3 al semi tecnificado. Valores permisibles: Bacterias Mesófilas Aerobias 100 UFC/g, Coliformes Totales en placa negativo, Hongos y Levaduras 10 UFC/g, Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Los resultados obtenidos también fueron analizados por el tipo de vainas, como se puede observar en la Tabla 14, como ya se había mencionado, el proceso de beneficiado es muy importante ya que la carga microbiana disminuye de forma significativa, una vez que las vainas verdes ya han sido procesadas.

Tabla 14: Resultados de los grupos indicadores ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) de inocuidad obtenidos en vainas verdes y beneficiadas.

Vainas	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	Bacterias Mesófilas Aerobias	Coliformes Totales	Hongos y Levaduras
1	4.05±0.93 ^b	3.89±0.59 ^a	4.57±0.73 ^a
2	3.76±0.86 ^{ab}	<1 ^b	2.78±1.77 ^b

Donde 1) corresponde a vaina verde y 2) vaina beneficiada, S/C sin crecimiento, Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Los resultados evaluados usando enriquecimiento resultaron similares a los obtenidos con peptona de caseína, excepto en bacterias mesófilas aerobias, donde el análisis estadístico nos muestra que se presentaron diferencias significativas, favoreciendo el aislamiento con la etapa de enriquecimiento para este grupo indicador (Tabla 14 y 15).

Tabla 15: Resultados de los grupos indicadores (Log_{10} UFC/g) de inocuidad obtenidos en vainas verdes y beneficiadas considerando la etapa de enriquecimiento en Soya Trypticaseína.

Vainas	Grupos Indicadores ^{1,2}		
	BMA	Coliformes	Hongos y Levaduras
1	4.17±0.75 ^a	3.93±0.61 ^a	4.57±0.49 ^a
2	4.26±0.98 ^a	<1 ^b	3.63±0.90 ^b

Donde 1) corresponde a vaina verde y 2) vaina beneficiada, S/C sin crecimiento, Se reportan los valores promedio de Log UFC/g, donde letras iguales no presentaron diferencia significativa entre sí ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la Prueba de Tukey realizada.

Adicionalmente puede observarse que las BMA's no presentaron diferencias significativas en los recuentos en vainas verdes y beneficiadas, lo cual sugiere que en cada etapa del proceso de beneficiado participan diferentes especies, las cuales son requeridas para el desarrollo del proceso de maduración, permitiendo que los recuentos de estas bacterias permanezcan constantes (Tabla 15). Sin embargo la diversidad de la microbiota bacteriana varió de acuerdo con el sistema de beneficiado.

En la Figura 14 se presentan las frecuencias de aislamiento de las enterobacterias provenientes de las vainas beneficiadas bajo el sistema rústico, donde es posible observar que las especies que fueron aisladas más frecuentemente correspondieron a los géneros *Pantoea*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Estas últimas corresponden al grupo coliforme, por lo cual podría proponerse que la contaminación de las vainas por estas enterobacterias se presenta durante las etapas posteriores al matado.

Pantepec fue la única localidad que presentó crecimiento del género *Pantoea sp.*, lo cual puede deberse a que este microorganismo, estuviese albergándose en las hojas de la planta de vainilla. De acuerdo con Jiménez, (2007) menciona que *Pantoea* puede infectar hojas y flores, formando manchas con halo amarillento en los ápices de hojas y flores que al avanzar puede causar necrosis en la planta, también afectando al fruto.

Hay microorganismos, en particular, que han sido investigados por su capacidad hidrolítica estando presentes en la pared celular primaria y secundaria de plantas, contribuyendo a la firmeza y la estructura de los tejidos vegetales. Diferentes enzimas pectinolíticas están involucrados en la descomposición de la pectina y están ampliamente distribuidos en una variedad de plantas y microorganismos. Para las plantas es muy importante, ya que ayudan en la extensión de la pared celular y el ablandamiento de los frutos (Gopinath y Suneetha, 2012).

Particularmente los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* han sido considerados como las bacterias pectinolíticas potentes.

Asimismo fue notable la diversidad de la microbiota presente en vainas procesadas por el beneficiado rústico donde fue posible aislar e identificar ocho géneros bacterianos diferentes (Figura 14). Los resultados mencionados sugieren que son requeridas condiciones de higiene para garantizar la inocuidad en las vainas.

En la Figura 15 se presentan los géneros identificados en las vainas beneficiadas bajo el sistema tradicional en el cual se redujo el número de géneros bacterianos aislados, en comparación con las vainas analizadas provenientes del sistema rústico (Figura 14). Los géneros con mayor frecuencia corresponden a *Citrobacter* y *Enterobacter*, con un porcentaje del 30%, asimismo fueron aislados dos géneros adicionales *Morganella* y *Providencia*. Estos aislamientos coinciden con lo reportado por Contreras (1996), quien realiza aislamiento de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Escherichia*, *Morganella*, *Staphylococcus* y *Salmonella* de varios vegetales crudos.

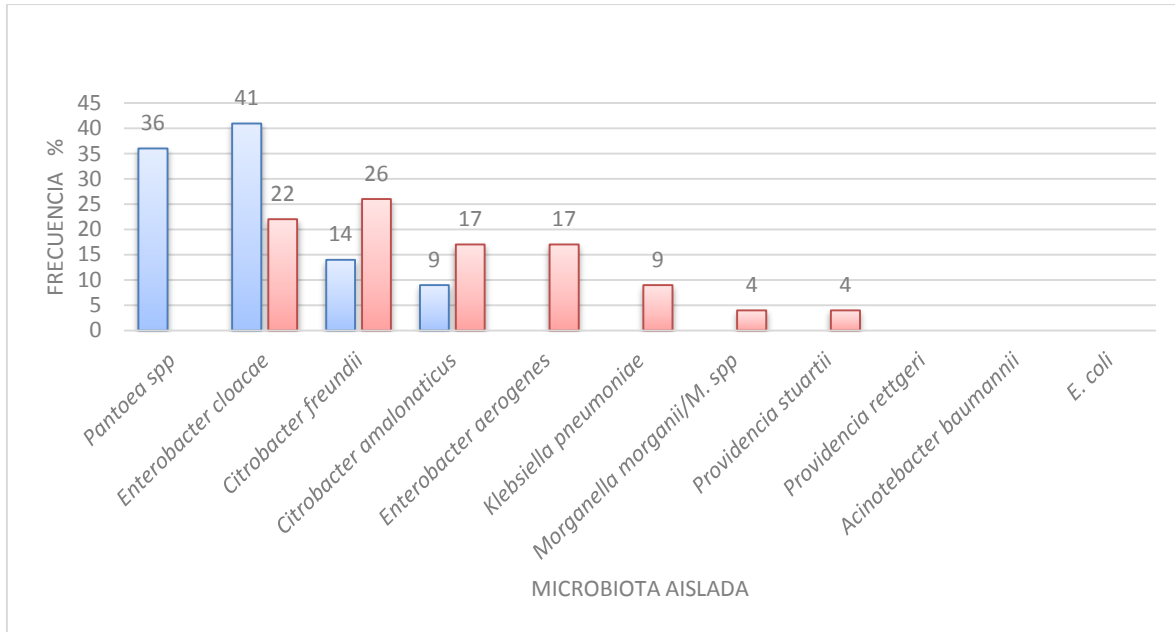


Figura 14. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los sistemas de beneficiado rústicos. ■ Localidad de Pantepec, ■ Localidad de Ayotoxco.

La microbiota aislada en el sistema de beneficiado rústico incluye con mayor frecuencia a *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* por lo que se debe a una posible re contaminación por tener contacto con otras vainas o por contacto con el suelo. La variedad de microbiota presente es notable ya que al usar este sistema de beneficiado no se cuenta con suficientes medidas de higiene.

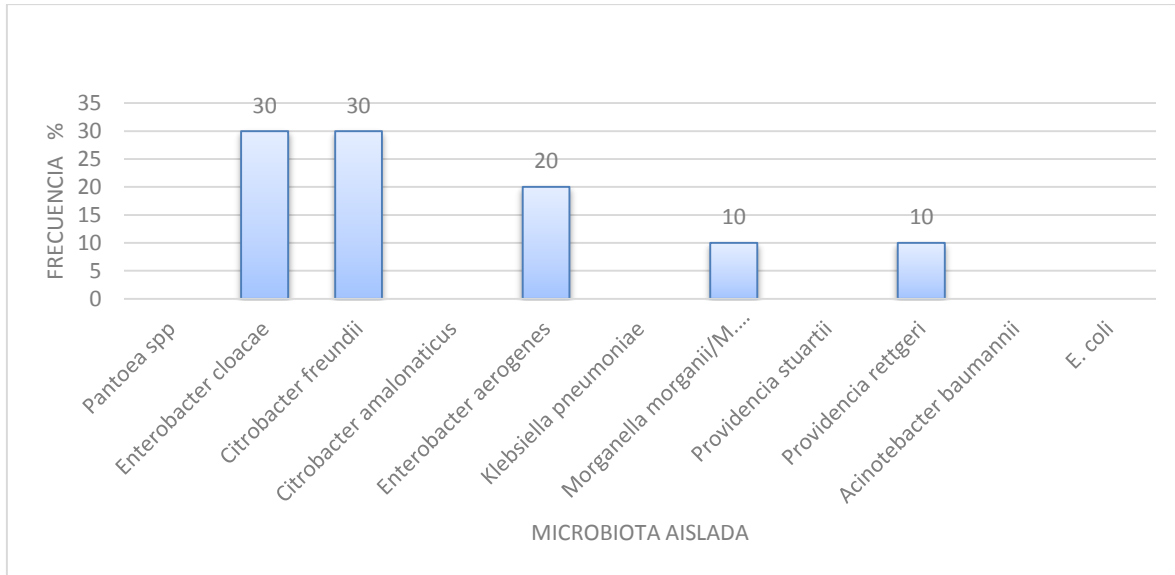


Figura 15. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con el sistema de beneficiado tradicional.

Finalmente en la Figura 16 se presentan los géneros aislados con mayor frecuencia en vainas procesadas en un sistema de beneficiado semi tecnificado, cuyas condiciones de matado corresponde a una temperatura aproximada de 80°C, de acuerdo con lo reportado por Naturland (2000) a estas vainas les corresponde un pH=6.7 y una aw=0.79; sin embargo al finalizar el proceso de beneficiado fue posible aislar algunas enterobacterias como *E. coli* (Tabla 16).

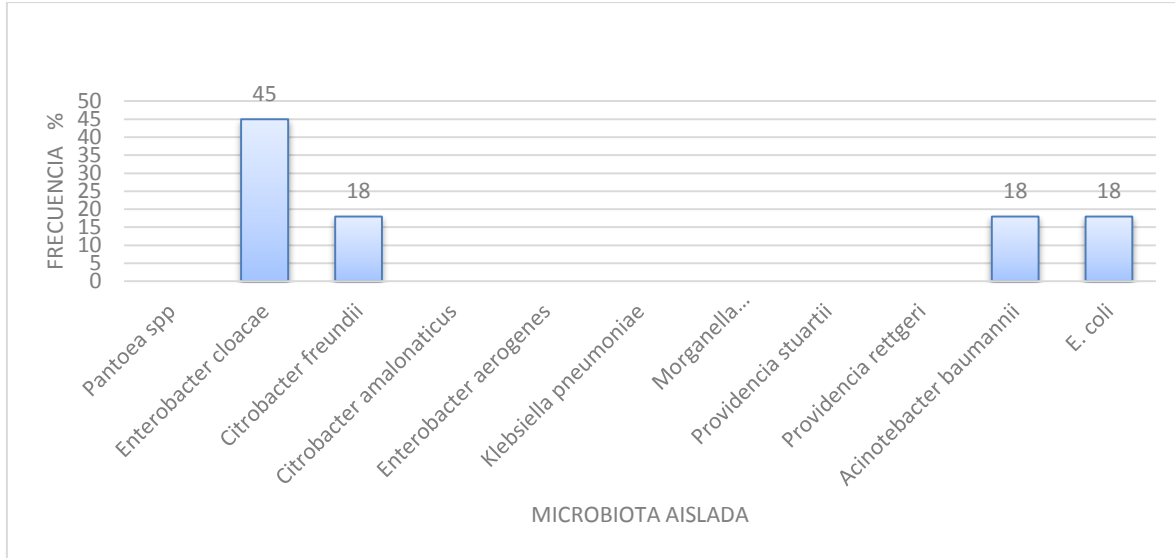


Figura 16. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con el sistema de beneficiado semi tecnificado.

En ambos tipos de vainas tanto verdes como beneficiadas la bacteria *Enterobacter cloacae* se mantiene constante, reduciéndose ligeramente su frecuencia de aislamiento en vainas beneficiadas como se muestra en las figuras 13 y 17.

En la Figura 17 se presentan todos los géneros bacterianos aislados en los diferentes sistemas de beneficio. Entre los géneros con mayor frecuencia en las cuatro regiones muestreadas se encuentran *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*, los cuales fueron capaces de sobrevivir durante el proceso de beneficio. Según con Flores-Torres, (2004) las condiciones óptimas de crecimiento de *Enterobacter cloacae* corresponden a una temperatura de 37°C. Las condiciones ambientales de temperatura pueden ser fácilmente alcanzables en las localidades consideradas, mientras que trabajos previos a esta investigación realizados por Naturland, (2000) evaluaron que el rango de pH en las vainas de vainilla correspondieron entre 5.2 y 6.7. Las condiciones mencionadas garantizan la sobrevivencia del género *Enterobacter*. Mientras que *Citrobacter freundii* perteneciente también a la familia Enterobacteriaceae al igual que *E. cloacae*, crece a una temperatura optima de 22 a 37°C y con un pH de 6 a 7 Pragma, (2012). *Citrobacter freundii* es un bacilo, aeróbico Gram negativo responsable de

infecciones nosocomiales, esta bacteria puede vivir en el suelo, agua y aguas residuales (Marinucci, 1987).

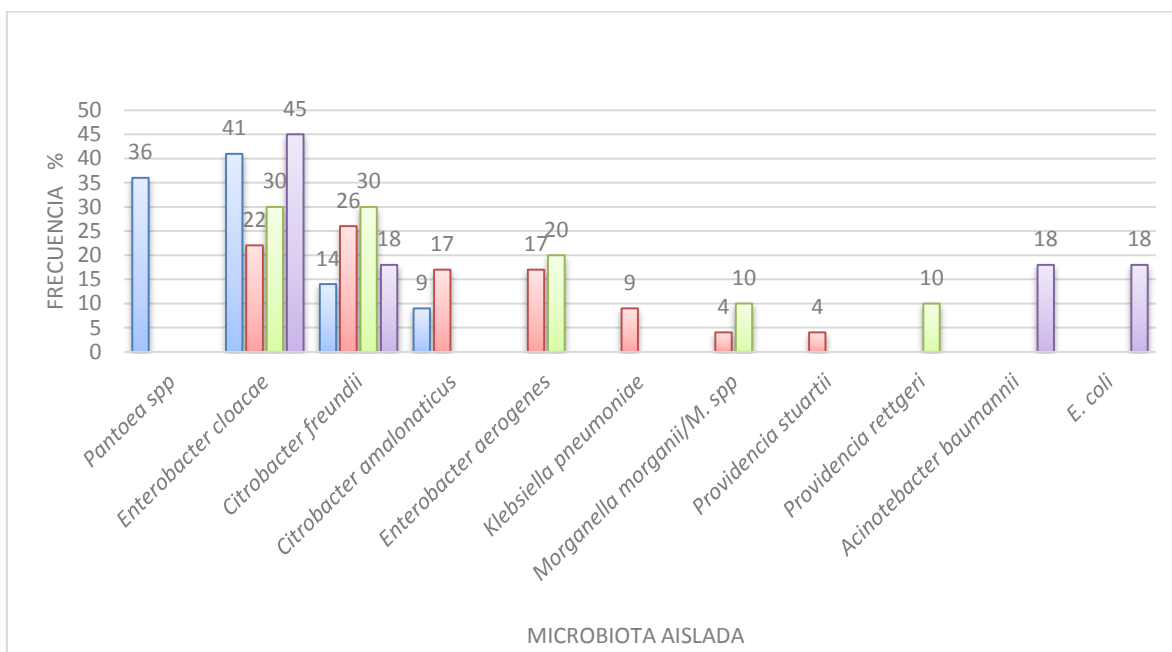


Figura 17. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas beneficiadas con los diferentes sistemas de beneficiado. ■ Localidad de Pantepec, ■ Localidad de Ayotoxco, ■ Localidad 1º de Mayo, ■ rancho 20 Soles.

En la Figura 18 se observan las frecuencias de aislamiento de ambos tipos de vainas: verdes y beneficiadas. El género microbiano más frecuente en ambos tipos de vaina es *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* para vainas verdes y *Citrobacter freundii* para vainas ya beneficiadas. En la Figura 18 también se observa como géneros de bacterias de vainas verdes como *Raoutella ornithinolytica* y *Acinetobacter calcoaceticus* no se encuentran en vainas beneficiadas, ya que aparecen otras bacterias como *Providencia* y *Acinetobacter baumannii*, posiblemente esto se deba a que las vainas en su proceso de beneficiado sufren una re contaminación en etapas posteriores del matado o por la manipulación del mismo productor.

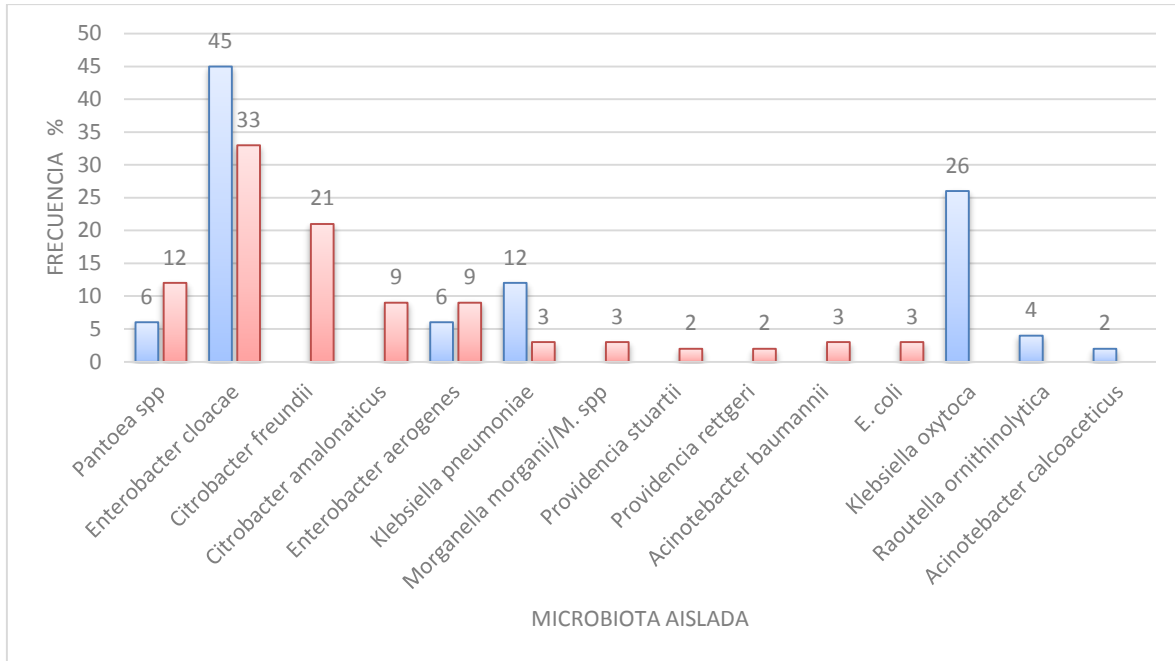


Figura 18. Frecuencia de aislamiento de la microbiota evaluada en vainas verdes y beneficiadas. ■ vainas verdes, ■ vainas beneficiadas.

De acuerdo con la Figura 17 se pudo observar que la diversidad de la microbiota va variando de acuerdo con cada localidad y sistema de beneficiado, los recuentos microbiológicos en el grupo indicador de coliformes totales salieron muy similares debido a que la etapa de matado de cada sistema de beneficiado elimina la mayor parte de estas enterobacterias, de ahí que se propuso calcular los índices de diversidad correspondientes a cada localidad y sistema de beneficiados (Tabla 16 y 17).

Tabla 16: Índices de diversidad y microbiota presente en vainas beneficiadas provenientes de diferentes localidades.

Localidad	Microorganismos	Índices de diversidad		
		H'	D	SCHAO1
Pantepec	<i>Pantoea spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	0.125	0.294	2.75
Ayotoxco	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia stuartii</i>	0.144	0.150	2.7
1º de Mayo	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia rettgeri</i>	0.142	0.155	2.33
20 Soles (Rancho)	<i>Acinotobacter baumannii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i>	0.132	0.236	1.37

El índice de diversidad de Simpson (D) representa la probabilidad de que dos organismos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar puedan pertenecer a la misma especie, Simpson, (1949) por lo tanto la localidad de Pantepec al tener más diversidad en microorganismos de la misma especie, con un valor de 0.294, su probabilidad de seleccionar un microorganismo es mínima como se observa en la (Tabla 16). Mientras que la localidad de Ayotoxco tiene un índice (D) más bajo con valor de 0.150, debido a que su diversidad de microorganismos es mayor y tiene más probabilidad de seleccionar una especie distinta elegida al azar, ya que esta localidad es muy abundante en especies.

El índice de Shannon-Wiener (H') es utilizado para medir la biodiversidad, contemplando la riqueza de especies y su abundancia basándose en un valor de 0 a 1. Si el valor es 0 solo hay una especie en la muestra y si (H') es mayor a 0

indica que hay especies representadas por el mismo número de individuos, por lo que la localidad de Ayotoxco es más abundante en número de individuos comparada con las otras localidades.

Con el índice Chao1 requerimos saber cuántas especies están representadas por solo un individuo en la muestra, y cuántas especies están representadas por dos individuos (Escalante-Espinosa, 2003)

Por lo tanto la región de Pantepec y Ayotoxco tienen una gran abundancia en microorganismos pertenecientes a cada una de las muestras, ya que sus valores son de 2.7 y 2.75.

Tabla 17: Índices de diversidad y microbiota presente en vainas beneficiadas utilizando diferentes sistemas de beneficiado.

Sistema de Beneficiado	Microorganismos	Índices de diversidad		
		H'	D	SCHAO1
Rustico	<i>Pantoea spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia stuartii</i>	0.107	0.954	2.72
Tradicional	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia rettgeri</i>	0.142	0.155	2.33
Semi Tecnificado	<i>Acinotobacter baumannii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i>	0.132	0.236	1.37

De acuerdo con el sistema de beneficiado, el sistema rústico mantiene sus índices de diversidad (D) y S_{CHAO1} altos con valores de 0.954 y 2.72 como se muestra en la Tabla 17, esto nos indica que no es muy probable seleccionar un organismo de la misma especie, ya que se cuenta con una gran abundancia de microorganismos. Mientras que el sistema tradicional tuvo un índice (H') alto con valor de 0.142, ya que su número de individuos es mucho mayor comparada con los demás sistemas de beneficiado.

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Entre las conclusiones más relevantes de esta investigación se mencionan las siguientes:

- El estudio para determinar la calidad microbiológica en vainas de vainilla se realizó durante el periodo productivo del 2013, siendo analizadas tanto vainas verdes como beneficiadas. Se trabajó con cinco distintos productores de las localidades del Totonacapan de Puebla-Veracruz.
- Se identificaron tres diferentes procesos de beneficiado: rústico, tradicional y semi-tecnificado, mismos que incluyeron en sus etapas de procesamiento la recepción, despezonado, primera clasificación, matado, sudado, tendido, reposo, segunda clasificación y empaçado.
- Los recuentos obtenidos en Bacterias Mesófilas Aerobias, en vainas verdes se encontraron en un intervalo de 3 a 6 Log₁₀ UFC/g, dependiendo del sitio de muestreo. Asimismo los valores de Hongos y Levaduras fueron de 3 a 6 Log₁₀ UFC/g. En relación con los valores de Coliformes Totales analizados las vainas verdes presentaron crecimiento en un intervalo de 3 a 5 Log₁₀ UFC/g, considerando los métodos de prueba de acuerdo con las NOM-112-SSA1-1994 (NMP) y NOM-113-SSA1-1994 (vertido en placa), considerando la etapa de enriquecimiento.
- Entre los géneros bacterianos identificados en vainas verdes con mayor frecuencia fueron: *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*.
- Los índices de diversidad calculados en relación con los géneros identificados en vainas verdes, mostraron índice de Shannon cuyo valor fue 0.628, índice de Simpson valor de 0.221 y Schao valor de 2.625.
- Los recuentos obtenidos en Bacterias Mesófilas Aerobias, en vainas beneficiadas se encontraron en un intervalo de 2 a 5 Log₁₀ UFC/g, dependiendo del sitio de muestreo. Asimismo los valores de Hongos y Levaduras fueron de 0 a 5 Log₁₀ UFC/g. En relación con los valores de Coliformes Totales analizados las vainas beneficiadas presentaron crecimiento en un intervalo de >1 Log₁₀ UFC/g, considerando los métodos

de prueba de acuerdo con las NOM-112-SSA1-1994 (NMP) y NOM-113-SSA1-1994 (vertido en placa), considerando la etapa de enriquecimiento.

- Entre los géneros bacterianos identificados en vainas beneficiadas con mayor frecuencia fueron: *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*.
- Los índices de diversidad calculados, en relación con los géneros identificados en vainas beneficiadas, mostraron índice de Shannon cuyo valor fue 0.144, índice de Simpson valor de 0.150 y Schao valor de 2.7.
- Se considera que el matado de fruto fue un punto crítico ya que esta etapa define la carga microbiana de los grupos indicadores Bacterias Mesófilas Aerobias con una disminución de 1 Log en el sistema de beneficiado rústico, Coliformes Totales con una disminución de 3 Log en el sistema de beneficiado semi tecnificado y 2 Log menos en Hongos y Levaduras del sistema de beneficiado rústico.

De acuerdo con las conclusiones mencionadas en este trabajo se sugiere dar continuación con posteriores investigaciones encaminadas en los siguientes aspectos.

- Se recomienda realizar una investigación más profunda cuyo objetivo sea identificar los grupos indicadores de inocuidad en cada una de las etapas del beneficiado.
- Identificación de géneros bacterianos y fúngicos por etapa de cada sistema de beneficiado.
- En base a la identificación mencionada se recomienda proponer un sistema de inocuidad que abarque las diferentes fuentes de contaminación durante el proceso de beneficiado.
- Relacionar los factores de crecimiento como pH, aw y porcentaje de humedad evaluado en las vainas provenientes de cada etapa del beneficiado con la microbiota identificada.

- Realizar una investigación extensiva con los demás estados productores de vainilla en México.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, R. (2004). *Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems*. IWA Publishing, Londres, para la organización mundial de la salud (suiza)
- Asociación Naturland. (2000). *Vainilla*. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Primera edición. Guías de cultivos
- Comité técnico estatal de evaluación de Puebla. (2011). *Estudio de evaluación y diagnóstico de la cadena productiva de vainilla puebla*. Consulta el 31 de mayo de 2014. En el sitio web http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/puebla/Documents/Diagnostico%20Vainilla_Puebla.pdf
- Contreras, L. (1996). *Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en lima metropolitana*. Consulta el 23 de febrero de 2014. En el sitio web http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/marchand_p_e/anteced.htm
- COVECA, (2010). Comisión veracruzana de comercialización agropecuaria. *Monografía de la vainilla*. Consulta el 28 de abril de 2013. En el sitio web <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/TAB4003236/VAINILLA2010.PDF>
- CONAVAI. (2007). Consejo Nacional de Productores Vainilleros. Consulta el 21 de diciembre de 2013. En el sitio web www.conavai.com.mx
- Curti, D.E. (1990). *Beneficiado de la vainilla*. Cultivo y Beneficiado de la Vainilla en México. México. Editorial ISBN (1989). pp 71-90
- Dien, B. Cotta J. (2003). *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status*. Appl Microbiol Biotechnol. 63:3 pp 258-66.
- Escalante, T. (2003). *¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao*. Elementos ciencia y cultura. 52:53-56.

- FAO, (2010). *Vanilla*. Consulta el 28 de abril de 2013. En el sitio web http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Vanilla.pdf
- Flores, T, F. (2004). *Efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción de exopolisacárido por una cepa nativa de Enterobacter cloacae*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Consulta el 21 de mayo de 2014. En el sitio web <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020127847.PDF>
- Fuentes-Hernández, J.M; Cepedillo-Jauregui, L. (2009). *Enfermedades transmitidas por los alimentos (E.T.A): Definición e historia*. Cuba
- Galeón, D. (2011). *Pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias*. Consulta el 22 de noviembre de 2013. En el sitio web <http://microinmuno.files.wordpress.com/2011/05/11-pruebas-bioquimicas-de-identificacion-de-enterobacterias.pdf>
- GDC, (2013). Gouvernement du Canada. *Bacteria found in french Vanilla*. Consulta el 24 de enero de 2014. En el sitio web <http://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2013/23261a-eng.php>
- Gopinath, R., Suneetha V. (2012). *Bacillus pectinolyase, A cock Tail Bacterial Enzyme from Kangayanellore Coconut Waste, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences Prevention*. 13(5):2015-2020.
- Guentzel, M. (1996). *Medical Microbiology*. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter and Proteus, 26 (1996)
- Herrera Cabrera, B, E., Salazar Rojas, V., Pierre Alain, G. (2008). *El beneficiado de la vainilla en la región del totonacapan Puebla-Veracruz*. p, 1-31. Colegio de Posgraduados. Puebla, México.
- INIFAP. (2010). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Consulta el 14 de diciembre de 2013. En el sitio web www.inifap.gob.mx
- Jiménez, O. (2007). *Identificación y caracterización de Pantoea agglomerans aislada en plantas de gloxinia (Gloxinia alba)*, Bioagro. 19(1).

- Kerler J. (2002). *Vanilla curing under laboratory conditions*. Dignum Food chemistry. Amsterdam. Editorial elsevier. (2001). pp165-171
- López López, D. (2012). *Calidad microbiológica y organoléptica de vainilla (vanilla planifolia andrews) beneficiada artesanalmente*. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados Instituto de enseñanza e investigación de ciencias agrícolas campus montecillo. Texcoco, Edo. De México.
- Lugo, A. (2012). *Recolección, cultivo y comercio de la vainilla en Veracruz durante el siglo XIX*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Consulta el 24 de mayo de 2014. En el sitio web <http://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icshu/n1/e1.html>
- Marinucci, G. (1987). *Citrobacter diversus ULA27 produces two forms of chromosomal*. J. Antimicrob. Chemother. 20:23-35.
- Molina, J. (2014). *Patotipos de Escherichia coli diarrogenica*. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México. Consulta el 12 de junio de 2014. En el sitio web <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- NMX-FF-074-SCFI-1996. Productos no industrializados para uso humano vainilla - (vanilla fragrans (salisbury) ames. Consulta el 23 de septiembre de 2013. En el sitio web <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2009/nmx-ff-074-scfi-2009.pdf>
- NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Consulta el 3 de septiembre de 2013. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Consulta el 31 de mayo de 2014. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Consulta el 18 de julio de 2014. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>

- NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Consulta el 31 de mayo de 2014. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html>
- NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Consulta el 3 de septiembre de 2013. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
- NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de salmonella en alimentos. Consulta el 3 de septiembre de 2013. En el sitio web <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>
- NSO 13.07.01.08. (2009). Norma Salvadoreña agua potable. Gerencia de atención integral en salud ambiental
- Nurawan, A. (1990). *Pathogenicity test of Fusarium oxysporum in different crops. Pemberituan Penelitian Tannaman Indutri*, 16: 50-52.
- Odoux, F. y Grisoni, S (2011). *Curing and laboratory conditions*. Vanilla. USA. Editorial CRC Press (2011). pp 173-229
- Oliver-Ros, C. (2007). *Manipulador de alimentos: importancia de la higiene en la elaboracion y servicio de comida*. 2th edn. Ideas propias editorial. España.
- OMS, (2005). Organización Mundial de la Salud. Cinco claves para la inocuidad de alimentos. Suiza
- Pla, L. (2006). *Inferencia basada en el indice de Shannon y la riqueza*. Biodiversidad. 8:31.
- Pragma, R. (2012). *Study of plasmid linked resistance pattern of MDR enterobacterial pathogens*. Consulta el 21 de mayo de 2014. En el sitio web http://www.academia.edu/3344369/Study_of_plasmid_linked_resistance_pattern_of_MDR_enterobacterial_pathogens
- Prescott, L., Harley, J. and Klein, D.A. (2002). *Microbiology*. 5th edn. McGraw-Hill. pp 820-950.
- Reyes López, D. (2008). *Beneficiado de los frutos de vainilla*. Beneficiado Tradicional de Vainilla. México. Editorial (2008). pp 27-58

- Roling, W. y Kerler, J. (2001). *Microorganisms with a Taste for Vanilla: Microbial Ecology of Traditional Indonesian Vanilla Curing*. Applied and environmental microbiology. 5(67): 1995-2002
- SAGARPA (2010). Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. *Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana*. Consulta el 15 de marzo de 2013. En el sitio web http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf
- Sánchez-Torres P. (2007). *Identification and Characterization of Fungi Associated with Esca in Vineyards of the Comunidad Valenciana*. Journal of Agricultural Research. 6(4): 650-660
- Sasikumar, B., Rema, J. AND Ravindran, P.N., (1992). *Vanilla*. *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal*, 16: 6-10.
- SENASA, (2004). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Bacterias y la temperatura. Consulta el 31 de mayo de 2014. En el sitio web <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=886&io=3795>
- Shukla, R.S., Kumar, S., Singh, H.N. and Singh, K.P., (1993). *First report of aerial blight of Coleus forskohlii caused by Rhizoctonia solani in India*. *Plant Disease*, 77:429.
- Simpson, E. (1949). *Measurement of diversity*. *Nature*, 163:688.
- Soto, A. (2006). *La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo*. Mexico, conabio. *Biodiversitas* 66:1, mayo-junio 2006, p.1-9
- Suseela Bhai, R., Ishwara Bhat, A and Anandaraj, M., (2003). *Premature yellowing and bean shedding in vanilla (Vanilla planifolia Andrews)*. Paper presented in *Symposium on Recent Development in the Diagnosis and Management of Plant Diseases for Meeting Global Challenges* held at Dharwad from 18-20 December 2003, pp 88-89.
- Thomas, J., (2003). *Vanilla diseases and remedies*. *Spice India*, 16: 36-38.
- Thomas, J., Suseela Bhai, R., (2000). Sclerotium rot – a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia Andrews*) in India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 9:175-176.

- Tombe, M., Tsuchiya, K., Nurawan, A., Nazurudin, S.B., Nikil, M. and Matsumoto, K., (1992). *Experiments on the introduction of biological and cultural control of stem rot disease of vanilla. Industrial Crop Research Journal*, 4: 20-26.
- Toro, M. y Bazo, I. (2008). *Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. Agronomía Trop.* 58(3): 215-221
- Universidad de Salamanca. Departamento de microbiología y genética. Consulta el 23 de septiembre de 2013. En el sitio web http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html
- Yang, J. y Li, X. (2008). *The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by enterobacter. From Vanilla root.* Process Biochemistry. 43:1132-1137

ANEXO 1

Entrevista para beneficiadores de vainilla

Mediante esta entrevista se pretende obtener información acerca de los diferentes tipos de beneficiado de vainilla, con la finalidad de poder identificar las diferentes etapas y condiciones, como parte del Macroproyecto vainilla.

I-. DATOS DE IDENTIFICACION.

1-. Nombre: _____ Edad: _____ Escolaridad: _____ Genero: _____

2-. Comunidad a la que pertenece: _____ Municipio: _____

II-. DATOS DE CULTIVO Y COSECHA DE LA VAINILLA.

1-. ¿Cultiva la vainilla? Si () No ()

2-. ¿Desde cuándo se dedica al cultivo? _____

3-. Además del cultivo de vainilla qué otras actividades de las que aparecen a continuación realiza:

Acopiador () Beneficiador () Productor de licor () Artesano () Comercializador ()

4-. ¿Cuántas hectáreas de terreno designa para el cultivo de la vainilla? Otro _____

1/4 Hectárea	1/2 Hectárea	3/4 Hectárea	1 Hectárea	2 Hectáreas	3 Hectáreas	4 Hectáreas	5 Hectáreas
-----------------	-----------------	-----------------	---------------	----------------	----------------	----------------	----------------

5-. ¿Qué extensión de terreno cosecha? Otro _____

1/4 Hectárea	1/2 Hectárea	3/4 Hectárea	1 Hectárea	2 Hectáreas	3 Hectáreas	4 Hectáreas	5 Hectáreas
-----------------	-----------------	-----------------	---------------	----------------	----------------	----------------	----------------

6-. ¿Qué cantidad de vainilla cosecha en kilogramos (en que años)? Otra cantidad _____

1-6 Kg	6-12 Kg	12-24 Kg	24-36 Kg	36-48 Kg	48-60 Kg	60-72 Kg	72-84 Kg
--------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

7-. ¿Cuántas veces al año cosechan vainilla?

Una vez al año	Dos veces al año	Tres veces al año	Cuatro veces al año
----------------	------------------	-------------------	---------------------

8- ¿Qué cantidad en kilogramos de vainilla verde vende? Otra cantidad_____

1-6 Kg	6-12 Kg	12-24 Kg	24-36 Kg	36-48 Kg	48-60 Kg	60-72 Kg	72-84 Kg
--------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

9- ¿Qué cantidad en kilogramos de vainilla verde destina al beneficiado? Otra cantidad_____

1-6 Kg	6-12 Kg	12-24 Kg	24-36 Kg	36-48 Kg	48-60 Kg	60-72 Kg	72-84 Kg
--------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

10- ¿Cuántos kilogramos de vainilla verde necesita para obtener un kilogramo de vainilla beneficiada?

4 Kg	5 Kg	6 Kg	7 Kg	8 Kg	9 Kg
------	------	------	------	------	------

11- ¿Qué cantidad obtiene después de beneficiar la vainilla?_____

III- DATOS DE PROCESO DE BENEFICIADO EN VAINILLA.

1- ¿Cuál de las siguientes etapas de beneficiado toma en cuenta para su proceso?

Recepción	Despezonado	Primera Clasificación	Matado	Sudado	Tendido	Reposo	Segunda Clasificación	Empacado
-----------	-------------	-----------------------	--------	--------	---------	--------	-----------------------	----------

RECEPCIÓN.

1- ¿Cuál de los siguientes parámetros toma en cuenta para la recepción de vainas verdes?

Longitud	Grado de Madurez	Aspecto	Color	Textura
----------	------------------	---------	-------	---------

2- ¿Qué rango de longitud debe contar las vainas en su recepción? Otro_____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

3- ¿Qué grado de madurez debe tener la vaina al recibirla? Otro_____

Poco maduros	Medio maduros	Maduros	Sobre maduros
--------------	---------------	---------	---------------

4- ¿Qué aspecto debe tener la vaina antes de su beneficiado? Otro _____

Vainas enteras sin rajadas	Vainas enteras con rajadas	Vainas rajadas	Vainas no rajadas	Vainas con manchas	Vainas sin manchas	Vaina parcialmente abierta	Vaina totalmente abierta
----------------------------	----------------------------	----------------	-------------------	--------------------	--------------------	----------------------------	--------------------------

5- ¿Qué color debe tener la vaina antes de su beneficiado? Otro _____

Verde uniforme	Verde brillante	Verde opaco	amarillento	Amarillento manchado
----------------	-----------------	-------------	-------------	----------------------

6- ¿Qué textura debe tener la vaina antes de su beneficiado? Otro _____

Textura suave	Textura rígida
---------------	----------------

DESPEZONADO.

1- ¿En qué consiste el despezonado? _____

CLASIFICACIÓN 1.

1- ¿En cuántas calidades separa las vainas? _____

2- ¿En cuántas clases según su calidad separa las vainas? _____

3- ¿En vainas de primera calidad que aspecto y tamaño debe tener? Otro _____

Vainas enteras grandes	Vainas enteras pequeñas	Vainas enteras rajadas
------------------------	-------------------------	------------------------

4- ¿En vainas de segunda calidad que aspecto y tamaño debe tener? Otro _____

Vainas zacatillo integras	Vainas zacatillo rajadas	Vainas zacatillo con hendiduras
---------------------------	--------------------------	---------------------------------

5- ¿En vainas de más calidades que aspecto y tamaño deben tener? _____

MATADO.

1- ¿Qué método de matado utiliza? Otro _____

Inmersión en agua caliente	Horneado de vainas	Cubierta de nylon	Exposición al sol	Congelación	Escaldado y autoclaveado
----------------------------	--------------------	-------------------	-------------------	-------------	--------------------------

2- ¿En el método de inmersión de agua caliente que temperatura utiliza? Otro _____

60°C	65°C	70°C	75°C	80°C	85°C	90°C	95°C	100°C
------	------	------	------	------	------	------	------	-------

3- ¿Durante cuánto tiempo deja sumergidas las vainas en agua caliente? Otro _____

1"	2"	3"	4"	5"	6"	7"
----	----	----	----	----	----	----

4- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

5- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

6- ¿En el método de horneado de vainas que temperatura utiliza? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

7- ¿Durante cuánto tiempo hornea las vainas? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

8- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

9- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

10- ¿En el método de cubierta de nylon que temperatura utiliza? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

11- ¿Durante cuánto tiempo deja cubiertas las vainas en nylon? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

12- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

13- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

14- ¿En el método de exposición al sol que temperatura utiliza? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

15- ¿Durante cuánto tiempo expone las vainas al sol? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

16- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

17- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

18- ¿En el método de congelación que temperatura utiliza? Otro _____

0°C	-5°C	-10°C	-15°C	-20°C
-----	------	-------	-------	-------

19- ¿Durante cuánto tiempo deja en congelación las vainas? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

20- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

21- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

22- ¿En el método de escaldado en laboratorio que temperatura utiliza? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

23- ¿Durante cuánto tiempo deja escaldando las vainas? Otro _____

1"	2"	3"	4"	5"	6"	7"
----	----	----	----	----	----	----

24- ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

25- ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

26- ¿En el método de autoclaveado en laboratorio que temperatura utiliza? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

27-. ¿Durante cuánto tiempo deja escaldando las vainas? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

SUDADO.

1-. ¿Qué tipo de sudado utiliza? Otro _____

Sudado en cajones de madera	Sudado en laboratorio
-----------------------------	-----------------------

2-. ¿Qué temperatura utiliza durante el sudado? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

3-. ¿Durante cuánto tiempo deja sudando las vainas? Otro _____

24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
-------	-------	-------	-------	-------

4-. ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

5-. ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

TENDIDO.

1-. ¿Por qué motivo se dejan las vainas a orear? _____

2-. ¿Qué temperatura utiliza durante el tendido? Otro _____

50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
------	------	------	------	------

3-. ¿Durante cuánto tiempo deja las vainas tendidas? Otro _____

4 hr	6 hr	8 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	22 hr	24 hrs
------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------

4-. ¿Cómo monitorea la temperatura? _____

5-. ¿Con que frecuencia monitorea tiempo y temperatura? _____

REPOSO.

1-. ¿Por qué se dejan reposar las vainas? _____

2-. ¿Durante cuánto tiempo deja reposar las vainas? Otro _____

30 días	35 días	40 días	45 días	50 días	55 días	60 días	65 días	70 días
---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

3-. ¿Con que frecuencia monitorea el tiempo? _____

CLASIFICACIÓN 2.

1-. ¿En cuántas categorías separa las vainas beneficiadas? _____

2-. ¿Qué parámetros utiliza para dar la segunda clasificación? Otro _____

Flexibilidad	Brillo	% Humedad	Color	Sabor	Aroma	Tamaño
--------------	--------	-----------	-------	-------	-------	--------

3-. ¿Qué flexibilidad deben tener las vainas beneficiadas? Otro _____

Flexibles	Poco flexibles	Sin flexibilidad
-----------	----------------	------------------

4-. ¿Qué brillo deben tener las vainas beneficiadas? Otro _____

Muy brillantes	Poco brillantes	Opacas
----------------	-----------------	--------

5-. ¿Qué porcentaje de humedad deben tener las vainas ya beneficiadas? Otro _____

10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
------	------	------	------	------	------	------

6-. ¿Qué color debe tener ya la vaina beneficiada? Otro _____

Café oscuro	Café negruzco	rojizas
-------------	---------------	---------

7-. ¿Qué sabor debe tener la vaina beneficiada? _____

8-. ¿Qué aroma debe tener la vaina beneficiada? _____

9-. ¿Con que rango de longitud deben contar las vainas beneficiadas? Otro _____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

EMPAQUE.

1-. ¿En qué categoría se basa para empaclar las vainas? Otro _____

Extra (Gourmet)	Categoría I (Gourmet-Ordinaria)	Categoría II (Gourmet-Ordinaria)	Categoría III (Ordinaria)
-----------------	------------------------------------	-------------------------------------	------------------------------

2-. En la categoría Extra (Gourmet) ¿Qué aspecto deben tener las vainas? Otro _____

Gruesa sin rayas, manchas, flexible y brillantes	Delgada con rayas y rajada	Delgada con rayas y rajada	Cualquier grosor puede estar rajada o rayada
--	----------------------------	----------------------------	--

3-. ¿Qué porcentaje de humedad deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
------	------	------	------	------	------	------

4-. ¿Qué longitud deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

5-. ¿Cuánto contenido de vainillina deben tener las vainas? Otro _____

1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

6-. En la categoría I (Gourmet-Ordinaria) ¿Qué aspecto deben tener las vainas? Otro _____

Gruesa sin rayas, manchas, flexible y brillantes	Delgada con rayas y rajada	Delgada con rayas y rajada	Cualquier grosor puede estar rajada o rayada
--	----------------------------	----------------------------	--

7-. ¿Qué porcentaje de humedad deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
------	------	------	------	------	------	------

8-. ¿Qué longitud deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

9-. ¿Cuánto contenido de vainillina deben tener las vainas? Otro _____

1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

10- En la categoría II (Gourmet-Ordinaria) ¿Qué aspecto deben tener las vainas? Otro _____

Gruesa sin rayas, manchas, flexible y brillantes	Delgada con rayas y rajada	Delgada con rayas y rajada	Cualquier grosor puede estar rajada o rayada
--	----------------------------	----------------------------	--

11- ¿Qué porcentaje de humedad deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
------	------	------	------	------	------	------

12- ¿Qué longitud deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

13- ¿Cuánto contenido de vainillina deben tener las vainas? Otro _____

1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

14- En la categoría III (Ordinaria) ¿Qué aspecto deben tener las vainas? Otro _____

Gruesa sin rayas, manchas, flexible y brillantes	Delgada con rayas y rajada	Delgada con rayas y rajada	Cualquier grosor puede estar rajada o rayada
--	----------------------------	----------------------------	--

15- ¿Qué porcentaje de humedad deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
------	------	------	------	------	------	------

16- ¿Qué longitud deben tener las vainas de esta categoría? Otro _____

10 cm	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	20 cm	22 cm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

17- ¿Cuánto contenido de vainillina deben tener las vainas? Otro _____

1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

18- ¿Qué tipo de empaque utiliza? _____