

Quality of green and cured vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) fruit in relation to its age at harvest

Calidad de fruto verde y beneficiado de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) con relación a su edad a la cosecha

Mavet Sánchez-Galindo¹; Ma. de Lourdes Arévalo-Galarza^{1*}; Adriana Delgado-Alvarado²; Braulio Edgar Herrera-Cabrera²; Cecilia Osorio-García¹

¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla núm. 25, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, C. P. 72760, MÉXICO.

*Corresponding author: larevalo@colpos.mx

Abstract

The fruit maturity index of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews is considered important to obtain high vanilla quality. In Mexico, the harvest is carried out when the distal part of the fruit turns yellow, but there is no evidence of the benefits of this practice. This research aimed to evaluate the quality of vanilla fruit at 224, 252 and 273 days after pollination, and its relationship with the aroma profile of cured vanilla. *Vanilla planifolia* flowers were manually pollinated in a commercial plantation and the fruit were harvested on each corresponding date. The evaluated variables were moisture, dry matter and content of sugars (glucose, fructose and sucrose), and in the cured fruit they were vanillin, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde. The results showed that the dry matter content and the sugar concentration of the green fruit of 252 days were significantly lower (14.92 and 10.6 %, respectively) than in the rest of the treatments. Likewise, in cured fruit of 252 days, the content of *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde was significantly lower (103, 855 and 1434 mg·kg⁻¹, respectively) than those of 224 days of age (148, 1132 and 2035 mg·kg⁻¹, respectively). The fruit of 252 days had a lower quality, possibly because their harvest coincided with the coldest month, which could affect the accumulation of dry matter and aromatic compounds.

Keywords:

p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, harvest index.

Resumen

El índice de madurez del fruto de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews se considera importante para obtener vainilla de calidad. En México, la cosecha se realiza cuando la parte distal del fruto se torna amarilla, pero no hay evidencia de los beneficios de esta práctica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad del fruto de vainilla a los 224, 252 y 273 días de edad, y su relación con el perfil de aroma de la vainilla beneficiada. Las flores de *Vanilla planifolia* se polinizaron manualmente en una plantación comercial y los frutos se cosecharon en cada fecha correspondiente. Las variables evaluadas fueron humedad, materia seca y contenido de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), y en fruto beneficiado fueron vainillina, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y *p*-hidroxibenzaldehído. Los resultados mostraron que el contenido de materia seca y la concentración de azúcares de los frutos verdes de 252 días fueron significativamente menor (14.92 y 10.6 %, respectivamente) que el resto de los tratamientos. Asimismo, en frutos beneficiados de 252 días, el contenido de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y *p*-hidroxibenzaldehído fue significativamente menor (103, 855 y 1434 mg·kg⁻¹, respectivamente) que los de 224 días de edad (148, 1132 y 2035 mg·kg⁻¹, respectivamente). Los frutos de 252 días tuvieron una calidad inferior, posiblemente porque su cosecha coincidió con el mes más frío, lo cual pudo afectar la acumulación de materia seca y de compuestos aromáticos.

Palabras clave:

ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, índice de cosecha.



Introduction

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) is one of the three species of the genus *Vanilla* that are grown commercially, accounting for 98 % of the world's commercial production, and is the most important due to the organoleptic properties of its fruit (Besse et al., 2004).

Vanilla fruit when harvested lacks aroma, so it must undergo curing to acquire aroma, brightness, color and texture. In general, this process consists of four steps: scalding, sunning/sweating, drying and conditioning (Odoux & Grisoni, 2011). According to Dunphy and Bala (2011), the main elements that define the quality of the cured fruit are: a) the fruit's genetic profile, b) geographical origin, soil, climate and growing conditions (irrigation and nutrition), c) stage of maturity at harvest, d) conditions of the curing process, and e) balance between the aromatic compounds, specifically between the content of vanillin and that of minor compounds (*p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde) (van Dyk, Barry-McGlasson, Williams, & Gair, 2010). The combination of these elements helps forge the vanilla's organoleptic characteristics.

The vanilla's green fruit contain different precursors of the aroma; glucovanillin is one of the most important and it accumulates in the fruit from 15 to 30 weeks after pollination (Havkin-Frenkel, Podstolski, Witkowska, Molecki, & Mikolajczyk, 1999). Traditionally, producers carry out the harvest when the distal part of the fruit turns yellow, which they consider as an adequate harvest index. However, there are no studies that show that the quality of the fruit harvested under this index is superior, nor has the influence of age at harvest on the organoleptic quality of cured vanilla fruit been proven.

Therefore, this research aimed to evaluate the quality of vanilla fruit at 224, 252 and 273 days of age (32, 36 and 39 weeks, respectively), and its relationship with the aroma profile of cured vanilla.

Materials and methods

The commercial vanilla plantation studied in this work is located in the town of Puntilla Aldama, belonging to the municipality of San Rafael, Veracruz, Mexico (20° 14' 4.49" North latitude and 96° 54' 13.75" West longitude, at 12 masl). The average temperature of this locality is 22.5 °C and its relative humidity is 90 % (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2017). The crop was established in the year 2000 under the shade mesh system with living tutors of Malabar chestnut (*Pachira aquatica*) and flame coral tree (*Erythrina coralloides*), in a luvisol-type soil. Among the main management

Introducción

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una de las tres especies del género *Vanilla* que se cultivan comercialmente, con 98 % de la producción comercial mundial, y es la de mayor importancia por las propiedades organolépticas de su fruto (Besse et al., 2004).

El fruto de la vainilla al ser cosechado carece de aroma, por lo que debe someterse a un beneficio para adquirir aroma, brillo, color y textura. De manera general, este proceso consta de cuatro pasos: escaldado, soleado/sudado, secado y acondicionado (Odoux & Grisoni, 2011). De acuerdo con Dunphy y Bala (2011), los principales elementos que definen la calidad del fruto beneficiado son: a) perfil genético del fruto, b) origen geográfico, suelo, clima y condiciones de crecimiento (riego y nutrición), c) estado de madurez a la cosecha, d) condiciones del proceso de beneficio, y e) balance entre los compuestos del aroma, específicamente entre el contenido de vainillina y el de compuestos menores (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y *p*-hidroxibenzaldehído) (van Dyk, Barry-McGlasson, Williams, & Gair, 2010). La combinación de estos elementos contribuye a forjar las características organolépticas de la vainilla.

Los frutos verdes de la vainilla contienen diferentes precursores del aroma, la glucovanillina es uno de los más importantes y se acumula en los frutos desde las 15 a las 30 semanas después de la polinización (Havkin-Frenkel, Podstolski, Witkowska, Molecki, & Mikolajczyk, 1999). Tradicionalmente, los productores realizan la cosecha cuando la parte distal del fruto se torna amarilla, lo que consideran como un índice de cosecha adecuado. Sin embargo, no existen trabajos que muestren que la calidad del fruto cosechado bajo este índice sea superior, ni tampoco se ha probado la influencia de la edad a la cosecha en la calidad organoléptica del fruto de vainilla beneficiado.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad del fruto de vainilla a los 224, 252 y 273 días de edad (32, 36 y 39 semanas, respectivamente), y su relación con el perfil de aroma de la vainilla beneficiada.

Materiales y métodos

La plantación comercial de la vainilla estudiada en este trabajo se ubica en la localidad de Puntilla Aldama, perteneciente al municipio de San Rafael, Veracruz, México (20° 14' 4.49" latitud norte y 96° 54' 13.75" longitud oeste, a 12 msnm). La temperatura promedio de esta localidad es de 22.5 °C y su humedad relativa de 90 % (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2017). El cultivo se estableció en el año 2000 bajo el sistema de malla sombra con tutores vivos de zapote reventador

activities, frequent pruning was done to the tutor to control the percentage of shade and the channeling of the vanilla on the tutor's branches, limiting the height of the binomial to two meters. Additionally, temperature data were taken from the Martínez de la Torre weather station (DGE)-VER, located 24.8 km from the plantation.

During the flowering period, between April and May 2015, one or two flowers per healthy *V. planifolia* plant were selected and manually pollinated, giving a total of 100 flowers. The three treatments were defined by the age of the fruit at harvest, namely 224, 252 and 273 days after pollination (dap) (32, 36 and 39 weeks, respectively), for which a completely randomized design was established.

The harvest was carried out during December 2015 and January-February 2016. At 273 dap, most of the fruit showed yellowing in the distal part (Figure 1). On the other hand, vanilla fruit were collected as a reference, where the color change in the distal part of the fruit was taken as the harvest index.

For each harvest date 30 fruit were taken for curing, and 10 more to perform quality evaluations in green state. The average weight of each green fruit was 9 to 15 g, with a size of 15 to 20 cm. The curing process of all the fruit, including the reference ones, was carried out in the "Beneficio la Alternativa" in the town of Primero de Mayo, Papantla, Veracruz.

Curing begins with the killing of the vanilla fruit (immersion in 70 °C water for 5 to 6 seconds). Afterwards, the fruit are accommodated in wooden boxes and covered to maintain the high temperature (45 to 65 °C) for 12 h; this activity is called sweating and provides the conditions for the production of

(*Pachira aquatica*) y pichoco (*Erythrina coralloides*), en un suelo tipo luvisol. Dentro de las principales actividades de manejo, se realizaron podas frecuentes al tutor para controlar el porcentaje de sombra y el encauzamiento de la vainilla sobre las ramas del tutor, limitando la altura del binomio a dos metros. Adicionalmente, se tomaron datos de temperatura de la estación meteorológica de Martínez de la Torre (DGE)-VER ubicada a 24.8 km de la plantación.

Durante el periodo de floración, entre abril y mayo de 2015, se seleccionaron una o dos flores por planta sana de *V. planifolia* y se polinizaron manualmente, dando un total de 100 flores. Los tres tratamientos se definieron por la edad del fruto a la cosecha: 224, 252 y 273 días después de la polinización (ddp) (32, 36 y 39 semanas, respectivamente); para lo cual se estableció un diseño completamente al azar.

La cosecha se realizó durante diciembre de 2015, enero y febrero de 2016. A los 273 ddp, la mayoría de los frutos mostraban amarillamiento en la parte distal (Figura 1). Por otro lado, se recolectaron frutos de vainilla como referencia, donde se tomó como índice de cosecha el cambio de color de la parte distal del fruto.

Por cada fecha de cosecha se tomaron 30 frutos para su beneficio o curado, y 10 frutos más para realizar evaluaciones de calidad en estado verde. El peso promedio de cada fruto verde fue de 9 a 15 g, con un tamaño de 15 a 20 cm. El proceso de beneficio de todos los frutos, incluyendo los de referencia, se realizó en el "Beneficio la Alternativa" en la localidad Primero de Mayo, Papantla, Veracruz.

El beneficio inicia con el matado del fruto de vainilla (inmersión en agua a 70 °C de 5 a 6 s), posteriormente, los frutos se acomodan en cajones de madera y se



Figure 1. Fruit of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews harvested at a) 224, b) 252 and c) 273 days after pollination. Figura 1. Frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cosechados a los a) 224, b) 252 y c) 273 días después de la polinización.

aromatic compounds. After the sweating, the fruit are exposed to the sun until reaching 45 °C, and again they are placed in the drawers so that they sweat. This cyclic operation is repeated between 20 and 30 times, until obtaining an entire cured fruit without physical damage that is flexible, reddish brown to bright dark brown, with 25 to 30 % moisture and a pleasant aroma. Finally, the cured vanilla is stored in plastic bags until marketing (Mariezcurrana, Zavaleta, Waliszewski, & Sánchez, 2008).

Variables evaluated

The variables evaluated in all the fruit were: dry matter (%), moisture (%) and total soluble sugars (%; glucose, fructose and sucrose); additionally, in cured fruit, the concentration of the four main aromatic compounds (*p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillin and vanillic acid) was measured, expressed as mg·kg⁻¹.

Dry matter (DM) and moisture (M): 500 mg of fruit were weighed and placed in trays inside an oven (Lab-Line Imperial®, AM, Inc, USA) with forced air at 80 °C for 48 h, until reaching constant weight. Subsequently, with the moisture percentage, the DM content was calculated.

Total soluble sugars (TSS): They were quantified with the methodology of Mustafa, Mustafa, Mustafa, and Mhemet (2003), with some modifications. A portion of the middle part of each fruit was taken, finely ground with a loading mill (25,000-rpm Krups Gx4100), 100 mg were weighed and 3 mL of 80 % (v/v) ethanol were added; the sample was incubated in a water bath at 80 °C for 10 min. This process was repeated successively five times, and the obtained extracts were placed in an oven at 55 °C for 24 h until dry. Subsequently, the residue was resuspended with 2 mL of distilled water. This sample was stored at -20 °C until analysis.

To quantify the sugars, 1 mL of each extract was taken and filtered in cleaning cartridges (Chromabond C18ec, 3 mL·500 mg⁻¹, 60Å, 45 µm). For this, the cartridge was conditioned with 6 mL of methanol and then 6 mL of HPLC-grade water; subsequently, 1 mL of sample was passed through it and a washing was performed with 3 mL of HPLC-grade water to ensure the elution of all sugars. Both filtrates were mixed and brought to a volume of 5 mL; from here, 1 mL was taken and filtered with an acrodisk (Titan, 0.45 µm). The filtrate was placed in a vial and analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography system, Series 200, Perkin Elmer™) with an autosampler and refractive index detector. A Pinnacle II Amino column (Restek™, 150 x 4.6 mm, 5 mm) was used, and the mobile phase was an acetonitrile:water (80:20, v/v) solution with a 14-min run time.

cubren para mantener la temperatura alta (45 a 65 °C) por 12 h, a esta actividad se le denomina sudado y proporciona las condiciones para la producción de compuestos aromáticos. Después del sudado, los frutos se exponen al sol hasta alcanzar 45 °C, y nuevamente se colocan en los cajones para que suden. Esta operación cíclica se repite entre 20 y 30 veces, hasta obtener un fruto beneficiado entero sin daños físicos, flexible, color café rojizo a café oscuro brillante, con 25 a 30 % de humedad y aroma agradable. Finalmente, la vainilla beneficiada se almacena en bolsas de plástico hasta su comercialización (Mariezcurrana, Zavaleta, Waliszewski, & Sánchez, 2008).

Variables evaluadas

Las variables evaluadas en todos los frutos fueron: materia seca (%), humedad (%) y azúcares solubles totales (%; glucosa, fructosa y sacarosa); adicionalmente, en frutos beneficiados se midió la concentración de los cuatro compuestos principales del aroma (*p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, vainillina y ácido vainillínico), expresados como mg·kg⁻¹.

Materia seca (MS) y humedad (H): Se pesaron 500 mg de fruto y se colocaron en charolas dentro de una estufa (Lab-Line Imperial®, AM, Inc, USA) con aire forzado a 80 °C por 48 h, hasta llegar a peso constante. Posteriormente, con el porcentaje de humedad se calculó el contenido de MS.

Azúcares solubles totales (AST): Se cuantificaron con la metodología de Mustafa, Mustafa, Mustafa, y Mhemet (2003), con algunas modificaciones. Se tomó una porción de la parte media de cada fruto, se molió finamente con un molino de carga (Krups Gx4100 de 25,000 rpm), se pesaron 100 mg y se adicionaron 3 mL de etanol a 80 % (v/v); la muestra se incubó en baño María a 80 °C por 10 min. Este proceso se repitió sucesivamente cinco veces, y los extractos obtenidos se colocaron en una estufa a 55 °C por 24 h hasta sequedad. Posteriormente, el residuo se resuspendió con 2 mL de agua destilada. Esta muestra se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Para cuantificar los azúcares, se tomó 1 mL de cada extracto y se filtró en cartuchos de limpieza (Cromabond C18ec, 3 mL·500 mg⁻¹, 60Å, 45 µm). Para ello, se acondicionó el cartucho con 6 mL de metanol y luego 6 mL de agua grado HPLC, posteriormente, se hizo pasar 1 mL de muestra y se realizó un lavado con 3 mL de agua grado HPLC para asegurar la elución de todos los azúcares. Ambos filtrados se mezclaron y se llevaron a un volumen de 5 mL; de aquí se tomó 1 mL y se filtró con un acrodisco (Titan, 0.45 µm). El filtrado se colocó en un vial y se analizó por HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Series 200,

For the calibration curves, 0.05 g of fructose, glucose and sucrose at 99.5 % (all from Sigma-Aldrich, USA) were diluted separately in 10 mL of methanol:water (1:9, v/v) and the corresponding dilutions (0.15 to 5 mg·mL⁻¹) were performed. Chromatograph conditions were 35 °C, flow of 1 mL·min⁻¹ and injection volume of 10 µL. The results were reported as a percentage of sugars on a dry basis.

Aromatic compounds: The *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and vanillin were quantified according to the method of Cicchetti and Chaintreau (2009), with some modifications. Then 0.05 g of milled sample were weighed and 18 µL of ethanol-distilled water (1:1) solution (HPLC-grade anhydrous absolute ethyl alcohol) were added; this solution was prepared 24 h beforehand and kept refrigerated (4 °C). Subsequently, the mixture was stirred for 30 min on a digital hotplate (6 stir, Thermo Scientific™, Cimarec™, USA) and again refrigerated for 24 h. After this time, the sample was stirred for 5 min and 1 mL was filtered with an acrodisc (Titan, 0.45 µm). The filtrate was placed in a 2-mL vial and taken to HPLC with a UV detector at 254 nm. For the analysis, a Silica C18 column (ACE®, 5 µm, 240 x 4.6 mm) was used, with a 20-min run time and a 10-µL injection volume.

For quantification, standard solutions of *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) were prepared from 0.1 to 10 µg·mL⁻¹, and vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) (Sigma-Aldrich®, USA) from 0.5 to 45 µg·mL⁻¹.

Statistical analysis

With the data obtained, an analysis of variance and Tukey's range test ($P \leq 0.05$) were performed. Additionally, a Pearson correlation analysis was carried out between the green fruit DM and the four aromatic compounds. For all analyses the Statistical Analysis System package (SAS Institute, 2002) was used.

Results and discussion

Vanilla fruit reaches its final size between 10 and 15 weeks after pollination, and no significant changes in its appearance are observed until the yellowing and dehiscence of the distal part begin (van Dyk et al., 2014). Therefore, producers cannot standardize a harvest index, not until they observe the change to yellow, which causes the aromatic quality of the cured vanilla to be very variable.

The DM content and moisture showed notable differences in green fruit; for example, the DM content was significantly higher ($P \leq 0.05$) in fruit of 224 and

Perkin Elmer™) con automuestreador y detector de índice de refracción. Se utilizó una columna Pinnacle II Amino de 5 mm 150 x 4.6 mm (Restek™), y la fase móvil fue una solución de acetonitrilo:agua (80:20, v/v) con tiempo de corrida de 14 min.

Para las curvas de calibración, se diluyeron por separado 0.05 g de fructosa, glucosa y sacarosa al 99.5 % (todos de Sigma-Aldrich, USA) en 10 mL de metanol:agua (1:9, v/v) y se realizaron las diluciones correspondientes (0.15 a 5 mg·mL⁻¹). Las condiciones del cromatógrafo fueron 35 °C, flujo de 1 mL·min⁻¹ y volumen de inyección de 10 µL. Los resultados se reportaron como porcentaje de azúcares en base seca.

Compuestos del aroma: Se cuantificó el *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y vainillina de acuerdo con el método de Cicchetti y Chaintreau (2009), con algunas modificaciones. Se pesaron 0.05 g de muestra molida y se agregaron 18 µL de solución etanol-agua destilada (1:1) (alcohol etílico absoluto anhidro grado HPLC); esta solución se preparó 24 h antes y se mantuvo en refrigeración (4 °C). Posteriormente, la mezcla se agitó por 30 min en una parrilla digital (6 stir, Thermo Scientific™, Cimarec™, USA) y nuevamente se refrigeró por 24 h. Transcurrido este tiempo, la muestra se agitó 5 min y se filtró 1 mL con acrodisc (Titan, 0.45 µm). El filtrado se colocó en un vial de 2 mL y se llevó al HPLC con detector UV a 254 nm. Para el análisis se utilizó una columna tipo Silica C18 de 5 µm 240 x 4.6 mm (ACE®), con tiempo de corrida de 20 min y volumen de inyección de 10 µL.

Para la cuantificación, se prepararon soluciones estándar de ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido vainillínico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) de 0.1 a 10 µg·mL⁻¹, y vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) (Sigma-Aldrich®, USA) de 0.5 a 45 µg·mL⁻¹.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Adicionalmente, se efectuó un análisis de correlaciones de Pearson entre la MS de frutos verdes y los cuatro compuestos del aroma. Para todos los análisis se empleó el paquete *Statistical Analysis System* (SAS Institute, 2002).

Resultados y discusión

El fruto de vainilla alcanza su tamaño final entre las 10 y 15 semanas después de la polinización, y no se observan cambios significativos en su apariencia hasta que inicia el amarillamiento y dehiscencia de la parte distal (van Dyk et al., 2014). Por ello, los productores no pueden estandarizar un índice de cosecha, sino

Table 1. Percentage of dry matter (DM) and moisture (M) in green and cured fruit of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews of different ages.**Cuadro 1. Porcentaje de materia seca (MS) y humedad (H) en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews diferentes edades.**

Fruit age (days after pollination)/ Edad de fruto (días después de la polinización)	Green fruit / Fruto verde		Cured fruit / Fruto beneficiado	
	MS	H	MS	H
	(%)			
224	16.84 a ^z	83.15 b	71.88 a	28.05 a
252	14.92 b	85.07 a	72.23 a	27.76 a
273	17.86 a	82.14 b	70.37 a	29.63 a
R ¹	16.71 a	83.27 b	71.95 a	28.12 a
CV (%)	8.77	1.74	1.81	4.58
LSD/DMSH	1.27	1.27	2.35	2.35

¹R: reference; CV: coefficient of variation; LSD: least significant difference.

^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹R: referencia; CV: coeficiente de variación; DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

273 days compared to those of 252 dap (Table 1). It is interesting to note that the DM content in the producer's reference fruit is similar to that of 224 days. Although the age of the fruit could be considered as a reliable parameter to determine a harvest index, climate changes in the area can affect DM reserves, which may explain, in part, why producers traditionally avoid harvesting in January.

According to the SMN (2017), during the harvest period of fruit of 224 days, the average temperature was 21.2 °C (December 2015), while when the fruit of 252 days were harvested, the temperature dropped drastically to 17 °C (January 2016), and for February the temperature increased again. In addition, during this period there was little precipitation, with a monthly average, from December to February, of 68.4 and 95.0 mm for the years 2013 to 2015, respectively, which could cause stress in the fruit, by reducing its reserves.

Van Dyk et al. (2014) evaluated vanilla fruit and found that at 105 dap the DM content was 10 % and the vanillin content 0 %, while at 280 dap the values were 18 % and 1.5 %, respectively. The above suggests that at a higher DM content there will be more reserves that will contribute to the aroma and flavor development of the cured fruit. It is important to note that even though the moisture content is reduced by more than 50 % from green to cured fruit, the differences that exist between the DM content and moisture among fruit ages at harvest disappear in the cured vanilla.

The purpose of curing is to create conditions for the substrate-enzyme interaction for the biosynthesis of

hasta que observan el cambio a color amarillo, lo que ocasiona que la calidad aromática de la vainilla beneficiada sea muy variable.

El contenido MS y humedad mostró diferencias notables en frutos verdes; por ejemplo, el contenido de MS fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en frutos de 224 y 273 días en comparación con los de 252 ddp (Cuadro 1). Es interesante notar que el contenido de MS en los frutos de referencia del productor es similar al de 224 días. Aunque la edad del fruto pudiera considerarse un parámetro confiable para determinar un índice de cosecha, los cambios de clima en la zona pueden afectar las reservas de MS, lo cual puede explicar, en parte, porque los productores tradicionalmente evitan cosechar en enero.

De acuerdo con el SMN (2017), durante el periodo de cosecha de los frutos de 224 días, la temperatura media fue de 21.2 °C (diciembre de 2015), mientras que cuando se cosecharon los frutos de 252 días, la temperatura descendió drásticamente a 17 °C (enero de 2016), y para febrero la temperatura incrementó nuevamente. Además, en este periodo se presentó poca precipitación, con promedio mensual, de diciembre a febrero, de 68.4 y 95.0 mm para los años 2013 a 2015, respectivamente; lo que pudo provocar estrés en el fruto, mermando sus reservas.

Van Dyk et al. (2014) evaluaron frutos de vainilla y encontraron que a los 105 ddp el contenido de MS fue de 10 % y el de vainillina de 0 %; mientras que a los 280 ddp los valores fueron de 18 % y 1.5 %, respectivamente. Lo anterior sugiere que a mayor contenido de MS

vanillin and other aromatic compounds, as well as the dehydration of the fruit as a method of conserving and retaining the aromatic compounds formed (Frenkel, Ranadive, Vázquez, & Havkin-Frenkel, 2011). According to NOM-182-SCFI-2011 (Secretaría de Economía, 2011), the moisture of the cured vanilla should be between 25 and 38 %, a range in which the evaluated treatments are found, without significant statistical difference ($P > 0.05$) (Table 1).

Generally, carbohydrates are the most abundant constituents in fruits after water. In green vanilla, the fruit of 224 dap had a significantly higher concentration (66 %, $P \leq 0.05$) of these compounds, compared to those of 252 dap, while this difference was lower in the fruit of 273 dap and the producer's reference ones (Table 2). The highest coefficients of variation were reported in the fructose and glucose content of green fruit, perhaps due to the combination of the high variability between the fruit and the low concentration of sugars. The rest of the variables had a coefficient of variation of less than 20 %, which indicates the reliability of the experimental data.

It is possible that the drop in temperature and the low rainfall, during the harvest at 252 dap, have influenced the reduction of sugar reserves as a result of stress. Despite these differences, it is notable that the sucrose content, in green fruit, represented, in the three stages of maturity, more than 80 % of the total sugars, followed by glucose and fructose (Table 2). These results coincide with those reported by Palama

habrá más reservas que contribuirán al desarrollo de aroma y sabor del fruto beneficiado. Es importante destacar que, aun cuando el contenido de humedad se reduce en más de 50 % de fruto verde a beneficiado, las diferencias que existen entre el contenido de MS y humedad entre edades del fruto a la cosecha desaparecen en la vainilla beneficiada.

El propósito del beneficio es crear condiciones para la interacción sustrato-enzima para la biosíntesis de vainillina y otros compuestos del aroma, así como la deshidratación de los frutos como un método de conservación y retención de los compuestos del aroma formados (Frenkel, Ranadive, Vázquez, & Havkin-Frenkel, 2011). De acuerdo con la NOM-182-SCFI-2011 (Secretaría de Economía, 2011), la humedad de la vainilla beneficiada debe estar entre 25 y 38 %, rango en el cual se encuentran los tratamientos evaluados, sin diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 1).

Generalmente, los carbohidratos son los constituyentes más abundantes en los frutos después del agua. En vainilla verde, los frutos de 224 ddp tuvieron una concentración significativamente mayor (66 %; $P \leq 0.05$) de estos compuestos, en comparación con los de 252 ddp, mientras que dicha diferencia fue menor en los frutos de 273 ddp y los de referencia del productor (Cuadro 2). Los coeficientes de variación más altos se reportaron en el contenido de fructosa y glucosa de fruto verde, quizás por la combinación de la alta variabilidad entre los frutos y la baja concentración de azúcares. El resto de las variables presentaron un coeficiente de

Table 2. Content of fructose, glucose, sucrose and total soluble sugars in green and cured fruit of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews of different ages.

Cuadro 2. Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y azúcares solubles totales en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de diferente edad.

Fruit age (days after pollination)/ Edad del frutos (días después de la polinización)	Green fruit /Fruto verde				Cured fruit /Fruto beneficiado			
	F ¹	G	S	TSS/AST	F	G	S	TSS/AST
	(%)							
224	0.81 a ²	2.27 a	12.93 a	16.02 a	3.04 a	9.17 a	7.04 a	19.26 a
252	0.55 bc	0.93 c	9.12 b	10.60 d	2.77 a	8.91 a	7.13 a	18.82 a
273	0.48 c	0.98 c	13.19 a	14.67 b	2.14 a	8.06 a	6.62 a	16.85 b
R	0.66 ab	1.34 b	9.75 b	11.76 c	1.16 b	6.43 b	5.31 b	12.91 c
CV (%)	27.00	21.95	10.69	8.41	13.06	9.28	9.62	6.04
LSD/DMSH	0.14	0.26	1.05	0.98	0.53	1.36	1.13	1.85

¹F: fructose; G: glucose; S: sucrose; TSS: total soluble sugars; R: reference fruit; CV: coefficient of variation; LSD: least significant difference.

²Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹F: fructosa; G: glucosa; S: sacarosa; AST: azúcares solubles totales; R: frutos de referencia; CV: coeficiente de variación; DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

²Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

et al. (2009), who found that three-month-old vanilla fruit accumulate more glucose, while eight-month-old ones contain more sucrose, as a reserve substrate.

In cured fruit, a significant decrease in sucrose content can be observed, with the consequent increase in fructose and glucose, without significant statistical differences ($P > 0.05$) attributable to the age of the fruit (Table 2). This is because during curing there are different enzymatic and non-enzymatic reactions, accelerated by the high humidity and temperature (45 to 65 °C). These reactions catalyze the hydrolysis and conversion of glucose and fructose. In addition, it is important to consider that the green fruit has certain starch reserves, which also contribute to increasing glucose and TSS (Havkin-Frenkel et al., 2004; Röling et al., 2001). On the other hand, the reference fruit (without age control) are those that have a significantly lower sugar content compared to the cured fruit (Table 2).

Although the aroma is the most important parameter in the marketing of cured vanilla, it is not the decisive factor to evaluate the quality. The acceptance and price of vanilla depends on the aromatic balance, size, appearance, color and moisture of the fruit (Secretaría de Economía, 2011; Sinha, Sharma & Sharma, 2008). Its aroma is a mixture of more than 200 volatile compounds, which include hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, lactones, acids, terpenoids, ethers, and phenolic and carbonyl compounds. Of these compounds, vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde), as the most abundant compound, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) and *p*-hydroxybenzoic acid are recognized as indicators of commercial quality due to their high concentrations and qualitative and quantitative participation in the aroma, since they represent 97 % of the total (Kumar-Keekan et al., 2010; Odoux & Grisoni, 2011).

The aroma profile, of the four most abundant compounds in cured fruit, showed significant statistical differences ($P \leq 0.05$), with the exception of vanillin. The cured fruit of 252 dap had the lowest concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde (Table 3), which may be the consequence of a lower DM content (Table 1) and which reflects a relationship with the minor compounds.

It is notable that the intervals established in NOM-182-SCFI-2011 (Table 3) are not similar to the data obtained, this discrepancy being more evident in *p*-hydroxybenzaldehyde, with values up to five times higher than those established in the standard. In the same way, Toth et al. (2011) reported high variability in the content of minor compounds in Mexican

variación menor a 20 %, lo cual indica la confiabilidad de los datos experimentales.

Es posible que el descenso de la temperatura y la poca lluvia, durante la cosecha a los 252 ddp, haya influido en la disminución de las reservas de azúcares como consecuencia del estrés. A pesar de esas diferencias, es notable que el contenido de sacarosa, en frutos verdes, representó, en los tres estados de madurez, más del 80 % del total de los azúcares, seguido de la glucosa y fructosa (Cuadro 2). Estos resultados coinciden con los reportados por Palama et al. (2009), quienes encontraron que los frutos de vainilla de tres meses de edad acumulan más glucosa, mientras que los de ocho meses contienen más sacarosa, como sustrato de reserva.

En frutos beneficiados, se puede observar un descenso significativo en el contenido de sacarosa, con el consecuente incremento en fructosa y glucosa, sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) atribuibles a la edad del fruto (Cuadro 2). Lo anterior debido a que durante el beneficio se presentan diferentes reacciones enzimáticas y no enzimáticas, aceleradas por la alta humedad y temperatura (45 a 65 °C). Dichas reacciones catalizan la hidrólisis y la conversión de glucosa y fructosa. Además, es importante considerar que el fruto verde tiene ciertas reservas de almidón, el cual también contribuye a incrementar la glucosa y los AST (Havkin-Frenkel et al., 2004; Röling et al., 2001). Por su parte, los frutos de referencia (sin control de la edad) son los que tienen un contenido de azúcares significativamente menor en comparación con los frutos beneficiados (Cuadro 2).

Aunque el aroma es el parámetro más importante en la comercialización de la vainilla beneficiada, no es el factor decisivo para evaluar la calidad. La aceptación y precio de la vainilla dependen del balance aromático, tamaño, apariencia, color y humedad del fruto (Secretaría de Economía, 2011; Sinha, Sharma & Sharma, 2008). Su aroma es una mezcla de más de 200 compuestos volátiles, que incluye hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, ácidos, terpenoides, éteres, y compuestos fenólicos y carbonílicos. De esos compuestos, la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), como compuesto más abundante, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vainillínico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) y el ácido *p*-hidroxibenzoico son reconocidos como indicadores de calidad comercial debido a sus concentraciones altas y su participación cualitativa y cuantitativa en el aroma, ya que representan 97 % del total (Kumar-Keekan et al., 2010; Odoux & Grisoni, 2011).

El perfil de aroma, de los cuatro compuestos más abundantes en frutos beneficiados, mostró diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), con excepción de la vainillina. Los frutos beneficiados

Table 3. Concentration of the aromatic compounds in cured fruit of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews of different ages.**Cuadro 3. Concentración de los compuestos aromáticos en frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de diferentes edades.**

Fruit age (days after pollination)/ Edad de fruto (días después de la polinización)	C1 ¹	C2	C3	C4	∑CM/C4 (%)
	(mg·kg ⁻¹ DM) / (mg·kg ⁻¹ MS)				
224	148.53 b ²	1,132.45 a	2,035.60 a	22,746 ab	14.0 b
252	103.03 c	855.77 b	1,434.60 b	22,231 ab	10.4 c
273	135.43 bc	1,297.50 a	1,980.00 a	25,043 a	13.2 b
R	226.74 a	1,197.44 a	2,130.60 a	20,978 b	16.6 a
CV (%)	14.55	12.2	9.7	9.9	9.2
LSD/DMSH	40.41	247.8	333.4	4090.20	0.01
NOM-182-SCFI-2011	58-100	411 – 861	219 - 498	Minimum /Mínimo 20,000	
Toth, Lee, Havkin-Frenkel, Belanger, and Hartman (2011)	218-255	887-1315	635-1549	9296-22,757	

¹C1: *p*-hydroxybenzoic acid; C2: vanillic acid; C3: *p*-hydroxybenzaldehyde; C4: vanillin; ∑CM/C4: sum of C1, C2 and C3, divided by C4; R: reference fruit; CV: coefficient of variation; LSD: least significant difference.

²Means with the same letter within each column are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹C1: ácido *p*-hidroxibenzoico; C2: ácido vainillínico; C3: *p*-hidroxibenzaldehído; C4: vainillina; ∑CM/C4: suma de C1, C2 y C3, entre C4; R: frutos de referencia; CV: coeficiente de variación; DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

²Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

vanilla and attributed it to the fact they are transition compounds. The above does not occur with vanillin because it is a final compound of biosynthesis, so its content is not very variable.

The analysis between the DM of the green fruit and the aroma compounds showed a significant correlation between DM and *p*-hydroxybenzaldehyde ($P \leq 0.05$), and a highly significant one ($P \leq 0.0001$) between the DM and the vanillin concentration (Table 4). Similarly, in vanilla fruit harvested in the previous cycle (year 2014), a significant correlation ($P \leq 0.01$) of 0.783 was observed between the DM content

de 252 ddp presentaron las concentraciones más bajas de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y *p*-hidroxibenzaldehído (Cuadro 3), que puede ser la consecuencia de un contenido de MS menor (Cuadro 1) y que refleja una relación con los compuestos menores.

Es notable que los intervalos establecidos en la NOM-182-SCFI-2011 (Cuadro 3), no sean similares a los datos obtenidos, siendo más evidente esta discrepancia en el *p*-hidroxibenzaldehído, con valores hasta cinco veces más altos que los establecidos en la norma. De la misma forma, Toth et al. (2011) reportaron alta variabilidad en el contenido de compuestos menores en vainilla

Table 4. Pearson correlation matrix of dry matter and content of aromatic compounds in cured vanilla fruit.**Cuadro 4. Matriz de correlación de Pearson de materia seca y contenido de compuestos del aroma en frutos de vainilla beneficiada.**

Compound/ Compuesto	DM ¹ /MS ¹	C1	C2	C3
C1	0.005 ns	-	-	-
C2	0.384 ns	0.376 ns	-	-
C3	0.500*	0.564*	0.650*	-
C4	0.773***	-0.264 ns	0.243 ns	0.350 ns

¹DM: dry matter; C1: *p*-hydroxybenzoic acid; C2: vanillic acid; C3: *p*-hydroxybenzaldehyde; C4: vanillin; ns = not significant; * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.0001$.

¹MS: materia seca; C1: ácido *p*-hidroxibenzoico; C2: ácido vainillínico; C3: *p*-hidroxibenzaldehído; C4: vainillina; ns = no significativo; * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.0001$.

and vanillin (data not reported), which supports the argument that DM accumulation can be proposed as a reliable harvest index, rather than changes in fruit color or phenological age. In this way, producers could record the DM of the fruit before 32 weeks, to ensure a higher vanillin content and better aromatic balance due to the accumulation of minor compounds (van Dyk et al., 2014).

Conclusions

Although curing defines the final quality of vanilla, the results obtained show that the percentage dry matter has a high correlation with the content of vanillin, the main compound of the aroma. In addition, the lower content of dry matter and total soluble sugars in green fruit influences the concentration of minor compounds (*p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde), which was significantly lower in 252-day-old fruit, harvested when the temperature dropped; the above resulted in cured vanilla having a lower aromatic balance.

Acknowledgments

The authors thank the SAGARPA-CONACYT fund through project 2012-04-190442 "Strategy of applied research for the strengthening, innovation and competitiveness of vanilla in Mexico" and Veremundo Rodríguez for curing the vanilla.

End of English version

References / Referencias

- Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., & Duval, M. F. (2004). Rapid genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*, 167(2), 379-385. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.007
- Cicchetti, E., & Chaintreau, A. (2009). Comparison of extraction techniques and modeling of accelerated solvent extraction for the authentication of natural Vanilla flavors. *Journal of Separation Science*, 32(11), 1957-64. doi: 10.1002/jssc.200800650
- Dunphy, P., & Bala, K. (2011). Green vanilla bean quality. *Perfumer & Flavorist*, 36, 38-46. Retrieved from <https://www.perfumerflavorist.com/fragrance/rawmaterials/natural/116757729.html>
- Frenkel, C., Ranadive, A. S., Vázquez, J. T., & Havkin-Frenkel, D. (2011). Curing of vanilla. In: Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. C. (Eds), *Handbook of vanilla science and technology* (pp. 79-106). USA: Wiley-Blackwell Pub.
- Havkin-Frenkel, D., French, J. C., Graft, N. M., Joel, D. J., Park, F. E., & Frenkel, C. (2004). Interrelation of curing and botany in vanilla (*Vanilla planifolia*)

mexicana, y lo atribuyeron a que son compuestos de transición. Lo anterior no ocurre con la vainillina debido a que es un compuesto final de la biosíntesis, por lo que su contenido es poco variable.

El análisis entre la MS de los frutos verdes y los compuestos del aroma mostró una correlación significativa entre MS y *p*-hidroxibenzaldehído ($P \leq 0.05$), y altamente significativa ($P \leq 0.0001$) entre la MS y la concentración de vainillina (Cuadro 4). De igual manera, en frutos de vainilla cosechados en el ciclo anterior (año 2014), se observó una correlación significativa ($P \leq 0.01$) de 0.783 entre el contenido de MS y la vainillina (datos no reportados); lo cual soporta el planteamiento de que la acumulación de MS puede proponerse como un índice de cosecha confiable, más que cambios en el color del fruto o la edad fenológica. De esta forma, los productores podrían registrar la MS de los frutos antes de las 32 semanas, para asegurar mayor contenido de vainillina y mejor balance aromático debido a la acumulación de compuestos menores (van Dyk et al., 2014).

Conclusiones

Aunque el beneficio define la calidad final de la vainilla, los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de materia seca tiene una correlación alta con el contenido de vainillina, compuesto mayoritario del aroma. Además, el menor contenido de materia seca y de azúcares solubles totales en frutos verdes, influye en la concentración de compuestos menores (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y *p*-hidroxibenzaldehído), que fue significativamente menor en frutos de 252 días de edad, cosechados cuando descendió la temperatura; lo anterior dio como resultado vainilla beneficiada con menor balance aromático.

Agradecimientos

Al fondo SAGARPA-CONACYT a través del proyecto 2012-04-190442 "Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la vainilla en México" y al Sr. Veremundo Rodríguez por realizar el beneficio de la vainilla.

Fin de la versión en español

- bean. *Acta Horticulturae*, 629, 93-102. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.629.12
- Havkin-Frenkel, D., Podstolski, A., Witkowska, E., Molecki, P., & Mikolajczyk, M. (1999) Vanillin biosynthetic pathways, an overview, In: Fu, T. J., Singh, G., & Curtis, W. R. (Eds), *Plant cell and tissue culture for the production*

- of food ingredients (pp. 35-43). New York, USA: Kluwer Acad. Press / Plenum Publ.
- Kumar-Keekan, K., Anantha-Kumar, A., Ahmad, R., Adhikari, S., Variyar, P. S., & Sharma, A. (2010). Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*). *Food Chemistry*, 122(3), 841-845. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.006
- Mariezcurrena, M. D., Zavaleta, H. A., Waliszewski, K. N., & Sánchez, V. (2008). The effect of killing conditions on the structural changes in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) pods during the curing process. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(8), 1111-1365. doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01691.x
- Mustafa, K., Mustafa, E., Mustafa, K. U., & Mehmet, A. (2003). Comparison of different extraction and detection methods for sugar using amino-bonded phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 41(6), 331-333. doi: 10.1093/chromsci/41.6.331
- Odoux, E., & Grisoni, M. (2011). Vanilla. *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. USA: Taylor and Francis Group.
- Palama, T. L., Khatib, A., Choi, Y. H., Payet, B., Fock, I., Verpoorte, R., & Kodja, H. (2009). Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *Food Chemistry*, 57(17), 7651- 7658. doi: 10.1021/jf901508f
- Röling, W. F. M., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., & van Verseveld, H. M. (2001). Microorganisms with a taste for vanilla: Microbial ecology of traditional Indonesian curing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 1995-2003. doi: 10.1128/AEM.67.5.1995-2003.2001
- Secretaría de Economía. (2011). *Norma Oficial Mexicana (NOM-182-SCFI-2011), Vainilla de Papantla, extractos y derivados-especificaciones, información comercial y métodos de ensayo*. México: Author.
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2017). Base de datos climática nacional. Sistema de información climática computadorizada (CLICOM). Retrieved June, 2017 from <http://clicom-mex.cicese.mx/mapa.html>
- Sinha, A.K., Sharma, U.K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 59(4), 299-326. doi: 10.1080/09687630701539350
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2002). *SAS/STAT user's guide version 9.0*. Cary: Author.
- Toth, S., Lee, K. J., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F. C., & Hartman, T. G. (2011). Volatile compounds in vanilla. In: Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. C. (Eds), *Handbook of vanilla science and technology* (pp. 183-219). USA: Wiley-Blackwell Pub.
- van Dyk, S, Barry-McGlasson, W., Williams, M., & Gair, C. (2010). Influence of curing procedures on sensory quality of vanilla beans. *Fruits*, 65(6), 387-399. doi: 10.1051/fruits/2010033
- van Dyk, S., Holford, P., Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., & McGlasson, B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168, 249-257. doi: 10.1016/j.scienta.2014.02.002