

## INFLUENCIA DE LAS FASES PRE-FERMENTATIVAS SOBRE LOS PRECURSORES TIÓLICOS VARIETALES

Daniela FRACASSETTI\*, Ivano DE NONI, Milda STUKNYTĖ, Valentina PICA, Antonio TIRELLI

Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria 2, Milano, Italia

\*Email: daniela.fracassetti@unimi.it



Trabajo presentado en el Enoforum Web Conference. Todos los vídeos y artículos del congreso están disponibles en [www.infowine.com](http://www.infowine.com)



### Introducción

Los tioles varietales son compuestos aromáticos que contienen azufre y que confieren al vino el aroma típico de ciertas variedades blancas, incluidas Sauvignon blanc, Catarratto Bianco Comune y Grillo. Entre ellos, la 4-sulfanil-4-metil-2-pentanona, el 3-sulfanil-1-hexanol (3SH) y su éster acetato se consideran los más importantes ya que presentan un umbral de percepción bajo, con magnitudes del orden del ng/L (Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1998; Roland et al., 2011; Coetzee y Du Toit, 2012). Los tioles varietales están presentes en las uvas en forma no volátil, unidos principalmente al glutatión (G) o a la cisteína (Cys), es decir, S-3-(hexan-1-ol)-L-glutatión (G-3SH), S-3-(hexano-1-ol)-L-cisteína (Cys-3SH), S-4-(4-metil-pentan-2-ona)-L-glutatión y S-4-(4- metil-pentan-2-ona)-L-cisteína.

Recientemente, Thibon y coautores (2016) identificaron el S-3-(hexanal)-glutatión (G-3SHal) como un precursor adicional de G-3SH. La formación de precursores de tioles volátiles del 3SH se ha asociado al (E)-2-hexenal o al (E)-2-hexenal-1-ol (Schneider et al. 2006, Harsch et al. 2013). El ácido linolénico puede liberar (E)-2-hexenal tras la acción de una enzima lipoxigenasa en presencia de oxígeno; A continuación, el (E)-2-hexenal se convierte en G-3SH al reaccionar con glutatión (GSH) (Hatanaka et al. 1995, Allen et al. 2011, Harsch et al. 2013). Además, el (E)-2-hexenal puede reaccionar con el sulfuro de hidrógeno liberado en las primeras etapas de la fermentación (Schneider et al. 2006, Roland et al. 2010, Pinu et al. 2012). *Saccharomyces* spp. puede oxidar (E)-2-hexen-1-ol y formar (E)-2-hexenal en condiciones aeróbicas, mientras que el proceso inverso puede ocurrir en condiciones anaeróbicas (Harsch et al. 2013).

Los tioles varietales son liberados de sus precursores por la actividad de la  $\beta$ -liasa de la levadura. Tanto *Saccharomyces* spp. como no *Saccharomyces* spp. han demostrado esta capacidad (Fracassetti & Vigentini, 2018; Ruiz et al., 2019). Además de la levadura utilizada para la fermentación alcohólica, otros factores pueden influir en el contenido de tioles varietales en el vino, como el uso de enzimas exógenas (Chen et al., 2018). La variedad de uva juega un papel importante en el contenido de precursores de tioles en el mosto (Chen et al., 2018). Recientemente se ha demostrado que la congelación de uvas y mostos contribuye al aumento de la concentración de precursores de tioles y tioles varietales (Chen, Capone, Nicholson, & Jeffery, 2019). Hasta ahora, la atención se ha centrado principalmente en la fermentación alcohólica, una de las principales fases de la vinificación. Solo unos pocos

estudios han investigado el papel de las operaciones prefermentativas en el contenido de precursores de tioles en el mosto. Fracassetti, Stuknyté, La Rosa, Gabrielli, De Noni y Tirelli (2018) observaron que el nivel de precursores de tioles disminuyó hasta un 95 % en las uvas Catarratto Bianco Comune y Grillo cuando se compararon mostos límpidos con mostos de uva. Aún no se han esclarecido las razones por las que se produjo la evidente pérdida de precursores tiólicos en los mostos elaborados en condiciones de bodega. Una mejor comprensión de estos aspectos podría tener un impacto significativo en las características gustativas del vino obtenido.

Este estudio tuvo como objetivo investigar la influencia de las fases de extracción, a escala de bodega, del mosto de uva Grillo en la concentración de precursores de tioles. También se elaboraron mostos de laboratorio con la misma variedad de uva del mismo lote en diferentes condiciones teniendo en cuenta: presencia de oxígeno, adición de anhídrido sulfuroso y consumo de iones cobre. La producción de mostos en condiciones controladas de laboratorio puede ayudar a entender los resultados de los ensayos realizados a nivel industrial, es decir en bodega, y evidenciar los factores que influyen en la concentración de precursores de tioles volátiles.

## **Materiales y Métodos**

### *Muestras de uva*

La uva Grillo se cosechó en 5,5 hectáreas de viñedos de Sant'Anna en la finca Regaleali, plantados a una altitud media de 520 m y con las hileras orientadas al sureste en Sclafani Bagni (Sicilia, Italia, coordenadas GPS HESI: 37,71°N, 13,85°E). El muestreo de la uva y la vendimia se realizaron en la campaña 2018.

### *Preparación del mosto en condiciones de bodega.*

Las uvas Grillo (6 toneladas) fueron cosechadas a mano en el momento de la maduración en cajas pequeñas (20 kg) para evitar dañar las uvas. La vinificación se llevó a cabo siguiendo los procedimientos normalmente adoptados por la bodega. Después del despalillado, se adicionó una enzima pectolítica (1 g/100 kg) a las uvas y se prensaron suavemente en una prensa de membrana en tanque cerrado sin eliminar el aire. El prensado se realizó en tres fases secuenciales a 20, 40 y 60 kPa durante 45 minutos cada una, obteniendo rendimientos de mosto del orden del 20%, 40% y 60%. Se realizó un muestreo posterior de mosto después de un prensado a 120 kPa durante 120 minutos, en el que el rendimiento de mosto fue de aproximadamente el 70%. Al mosto (50 hL) se le añadió 30 mg/L de anhídrido sulfuroso para evitar oxidaciones, se bombeó al tanque de clarificación, se enfrió a 7°C y se dejó decantar durante 12 horas. El proceso de extracción del mosto se realizó en condiciones de exposición al aire (mostos expuestos al aire, AEM) y ausencia de aire (mostos sin aire, AFM); este último se obtuvo mediante saturación de prensa, tuberías y tanque con anhídrido carbónico. Las muestras de mosto para el análisis de precursores tiólicos se recogieron en diferentes momentos de las etapas de prefermentación, tal como se esquematiza en la Figura 1. Las muestras de mosto se tomaron después del estrujado, durante el escurrido, durante el prensado con rendimientos del 20%, 40%, 60% y 70% [final del prensado], durante el trasiego al tanque de clarificación, en el tanque de clarificación y después de la clarificación. Al final se realizaron nueve muestreos de mosto (Figura 1). Todas estas muestras se tomaron por

triplicado en botellas de 500 ml, se llenaron con nitrógeno y se congelaron rápidamente a -18 °C hasta su análisis.

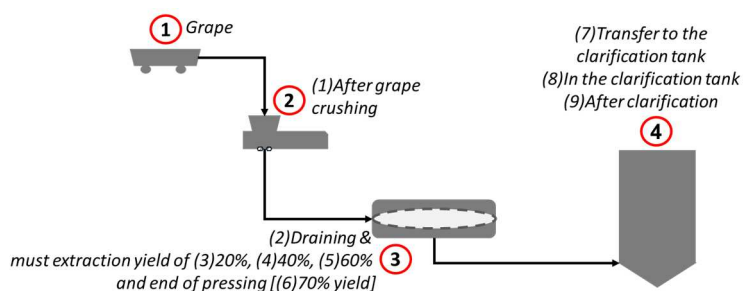


Figura 1: Esquema de muestreo de los mostos elaborados en bodega. Los puntos de muestreo se indican entre paréntesis.

### Preparación del mosto producido en laboratorio

El diseño experimental para las muestras de mosto tratadas en laboratorio incluyó 4 condiciones diferentes: i) adición de fluoruro de sodio y EDTA (2 mL 0,12 mol/L NaF y 0,5 mL 0,06 mol/L EDTA) (Fracassetti y Tirelli, 2015), ii) lavado y secado suave de hollejos de uva, iii) adición de anhídrido sulfuroso (50 mg/kg) y iv) ninguna adición (control).

Se tomaron aproximadamente 20 kg de uvas Grillo aleatoriamente de la masa cosechada y se enfriaron a 4°C durante la noche antes de su uso. Las uvas se extrajeron de los racimos cortando el pedúnculo para evitar dañar las bayas y se dividieron en cuatro alícuotas iguales. Cada alícuota se dividió a su vez en 2 alícuotas para obtener los mostos experimentales mediante (i) prensado en condiciones de exposición al aire [oxic-presencia de oxígeno] y (ii) prensado en condiciones de ausencia de aire [anoxic-anóxico]. El prensado manual se realizó en un vaso de precipitados en el caso de las condiciones de exposición al aire y en bolsas de plástico herméticas al gas envasadas al vacío en el caso de las condiciones sin aire. Para las condiciones sin aire, las muestras de mosto se transfirieron a matraces llenos de nitrógeno y se sometieron a flujo de nitrógeno. Las muestras con cada una de estas condiciones se realizaron por triplicado obteniendo un total de 24 muestras de mosto producidas en laboratorio. Todos los tubos se llenaron con nitrógeno y se congelaron inmediatamente a -18 °C hasta su análisis.

### Determinación de cisteína, glutatión y "grape reaction product"

Las concentraciones de Cys, GSH y Grape Reaction Product (GRP) en muestras de uva, mosto y vino se analizaron según lo descrito por Fracassetti y Tirelli (2015). Brevemente: las muestras de mosto se centrifugaron y se derivatizaron 2 ml de sobrenadante con p-benzoquinona. Las concentraciones de Cys, GSH y GRP se analizaron por HPLC-UV a 303 nm.

### Determinación de precursores de tioles varietales

Los precursores tiólicos se analizaron en las muestras de mosto, tras la adición de un estándar interno (IS) d1-G-3SH (500 µg/L) y la purificación SPE con cartuchos poliméricos Strata X (200 mg, Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) (Fracassetti et al. al., 2018). La detección y cuantificación de precursores tiólicos se realizó mediante análisis UPLC/ESI-HRMS [módulo

de separación Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive híbrido cuadrupolo-Orbitrap a través de una sonda HESI-II para ionización por electrospray (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las condiciones de separación y detección publicadas por Fracassetti et al. (2018).

#### *Determinación del cobre*

La cuantificación de cobre fue realizada por un laboratorio acreditado UNI CEI EN ISO/IEC 17025 según el método de referencia MA-F-AS322-06-CUIVRE (2010) mediante espectroscopia de absorción atómica (límite de detección: 0,05 mg/L).

#### *Análisis estadística*

Se realizó ANOVA unidireccional utilizando el software Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, 269 OK, EE. UU.). Se realizó la prueba *Tukey post-hoc* y se consideraron diferencias significativas a un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados y discusión**

### *Precursores de tioles en mostos a escala de bodega*

El contenido de cobre fue inferior a 1 mg/L en todas las fracciones de mosto recogidas durante las fases de extracción. Se observaron niveles comparables de cobre tanto en AEM como en AFM en muestras de despallado (0,87 mg/L), escurrido (0,57 mg/L) y rendimiento del 60 % (0,81 mg/L), sin embargo, se encontraron concentraciones más altas en muestras con rendimientos de 20 % y 40 % en AFM (0,76 mg/L y 0,85 mg/L frente a 0,61 mg/L y 0,76 mg/L en AEM, para muestras con rendimiento del 20 % y 40 %, respectivamente). Esto sugiere que el cobre se puede extraer más rápido durante las etapas prefermentativas en condiciones anaeróbicas; sin embargo, al final del prensado, se encontraron concentraciones similares de cobre tanto en condiciones AEM como AFM (70 % de rendimiento de la muestra, 0,50 mg/L). El prensado condujo a una disminución del cobre, en desacuerdo con Bekker et al. (2019).

Se evaluaron los niveles de precursores de tioles en uva y mosto durante las fases de extracción del mosto en condiciones de bodega. De acuerdo con Fracassetti et al. (2018), los precursores de 4MMP, así como GluCys-3SH y CysGly-3SH, no se detectaron en muestras de zumo y de mosto. En su lugar, se encontraron Cys-3SH, GSH-3SH y G-3SHal. El contenido de G-3SHal en uva ( $5,21 \pm 1,28$  mg/L) fue superior al de G-3SH ( $178,07 \pm 25,14$   $\mu$ g/L) y al de Cys-3SH ( $9,43 \pm 3,66$   $\mu$ g/L), pero disminuyó en más de un 90% después del prensado de la uva en condiciones de bodega (Figura 2). Se encontraron menores pérdidas de G-3SH y Cys-3SH durante las etapas de extracción del mosto. En la mayoría de las muestras, cuando se observó un aumento en G-3SH, también se observó un aumento en Cys-3SH con un mayor rendimiento de extracción de mosto, especialmente en condiciones de exposición al aire. Resultados similares han sido descritos por Roland et al. (2010), quienes observaron un aumento en G-3SH en mosto prensado a mano y con adición de aire durante el prensado. En las fracciones de mosto tomadas durante las fases prefermentativas, la concentración de Cys-3SH aumentó (Figura 2A). Podemos suponer que la peptólisis de G-3SH ocurrió en el mosto tan pronto como comenzó la extracción, ya que Cys-3SH estaba ausente en la uva (Figura 1). Sin embargo, el gradiente de concentración de precursores tiólicos detectado en la uva no puede explicar completamente los niveles más altos de G-3SH y Cys-3SH detectados en los mostos producidos por AEM (Figura 2A y Figura 2B). Los niveles de G-3SH detectados en las muestras de AEM fueron significativamente más altos que los encontrados en las muestras

de AFM (Figura 2B). G-3SHal mostró un comportamiento diferente: su concentración disminuyó drásticamente después del estrujado de la uva y fluctuó aleatoriamente en las diferentes fracciones de mosto de uva. Sin embargo, G-3SHal mostró valores superiores en el AEM, excepto en la muestra del tanque de clarificación (Figura 2C). La gran pérdida de G-3SHal tras el estrujado de la uva (-95%) podría deberse a la adición de metabisulfito durante el despallado. La adición de anhídrido sulfuroso condujo a concentraciones más bajas de G-3SHal, especialmente en las muestras de AFM (Figura 2 y Tabla 1), y podría deberse a vías de síntesis oxidativa limitadas. Estos resultados concuerdan con los proporcionados por Thibon et al. (2016) que evidenciaron la importancia de añadir anhídrido sulfuroso en la prensa. Del mismo modo, considerando los datos relativos a las muestras de mosto "sin adición/tratamiento" (Tabla 1) en condiciones de laboratorio, el papel de la exposición al aire es aún más claro si consideramos el G-3SHal, que alcanza los  $1780 \pm 1717 \mu\text{g/L}$  en condiciones de exposición al aire, y solo los  $342 \pm 206 \mu\text{mol/L}$  cuando no se aplicó ninguna aireación. Esto podría estar relacionado con una importante actividad de la lipoxigenasa que mejora la disponibilidad de (E)-2-hexenal y la posterior formación de G-3SHal mediante la adición de GSH, como evidenciado previamente en la literatura (Roland et al., 2010; Thibon et al. 2016; Clark & Escritura, 2018). Esta hipótesis podría estar respaldada por las cantidades no detectables de GSH libre en la muestra despallada (datos no mostrados) y en las muestras de mosto producidas en laboratorio "sin adición/tratamiento" (Tabla 1).

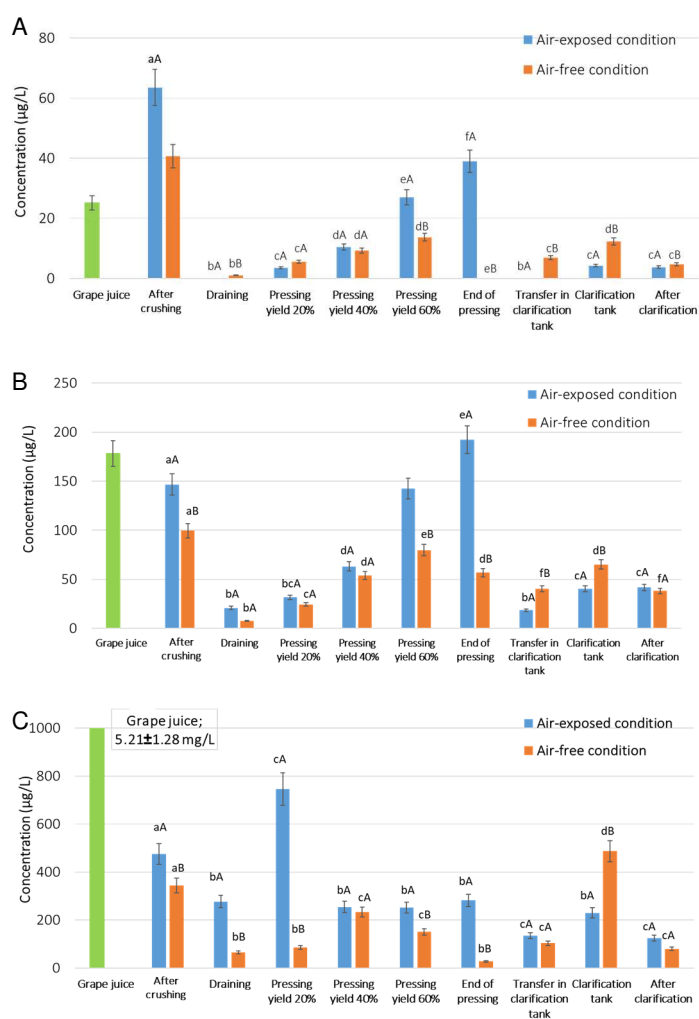


Figura 2: Concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ ) de (A) S-3-(hexano-1-ol)-L-cisteína (Cys-3SH), (B) S-3-(hexano-1-ol) -L - glutatión (G-3SH) y (C) S-3-(hexanal)-glutatión (G-3SHal).

Letras diferentes significan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Las letras mayúsculas se refieren a condiciones de exposición al aire frente a condiciones sin aire; las letras minúsculas se refieren a muestras de mosto tomadas en diferentes etapas de la fase prefermentativa con las mismas condiciones de exposición al aire/sin aire.

### *Precusores de tioles en mostos elaborados en laboratorio*

La adición de anhídrido sulfuroso a las uvas justo antes de la extracción del mosto en condiciones de laboratorio dio como resultado los niveles más altos de GSH y los niveles más bajos de GRP en las muestras de AEM. Además, la adición de anhídrido sulfuroso dificultó la formación de G-3SHal (Tabla 1), ya que se favorece el producto de adición de sulfito de hidrógeno sobre el aldehído libre (Clark y Deed, 2018). La adición de anhídrido sulfuroso hizo posible detectar la Cys presente en trazas o incluso ausente en todas las demás condiciones de prensado consideradas (Tabla 1). El GRP se encontró en un rango de concentración de 0.38-3.83 mg/L. Dado que este compuesto tiene un origen oxidativo, se esperaban resultados similares en las muestras de AFM, pero en cambio los niveles de GRP fueron comparables, o incluso superiores, a los observados en las muestras de AEM. La pérdida de GSH no es posible explicarla en función de los bajos niveles de GRP detectados en los tratamientos AEM, pero cuantitativamente es comparable a la formación de G-3SHal cuando la extracción del mosto de uva se realiza en ausencia de anhídrido sulfuroso (Tabla 1). Por tanto, aunque la adición de anhídrido sulfuroso impide la actividad de la polifenol oxidasa, puede también limitar la formación de G-3SHal y, en consecuencia, de G-3SH (Thibon et al., 2016).

La presencia de cobre es otra causa potencial de pérdida de G-3SH. Al igual que con otros compuestos tiólicos, el GSH puede unirse fácilmente al cobre para formar complejos de sulfuro de cobre estables y apenas insolubles, cuya formación es independiente del oxígeno (Ahmed, 2014; Ngamchuea et al., 2016). Bajo condiciones AEM, el complejo cobre-GSH podría formarse lentamente y el cobre podría oxidar el GSH para dar glutatión oxidado (GSSG) en condiciones oxidativas.

Para evaluar el papel de los iones de cobre en el contenido de precursores tiólicos, se utilizó un mosto de laboratorio obtenido después de la adición de compuestos quelantes de iones metálicos (NaF y EDTA) (Janovitz-Klapp et al. 1990; Fracassetti y Tirelli, 2015). Los datos evidencian el efecto significativo de los iones de cobre: la eliminación química del cobre permitió la formación importante de G-3SHal, especialmente en condiciones de exposición al aire ( $14573 \pm 881 \mu\text{g/L}$ ) (Tabla 1). Esto puede deberse a la mayor cantidad de (E)-2-hexenal producido (Roland et al., 2010). En las muestras a las que se añadieron NaF y EDTA, se impidió la formación de G-3SH, con la excepción de las muestras sin adición/tratamiento en las que el G-3SH fue comparable al encontrado en la muestra con adición de NaF y EDTA. La formación de G-3SHal en el mosto también aumentó cuando el cobre presente en los hollejos de la uva se eliminó mediante una solución de ácido cítrico, pero en mucha menor medida que con las sales quelantes (Tabla 1). Sin embargo, el nivel más alto de G-3SH, así como de Cys-3SH, se detectó en esta última condición, lo que significa que el lavado de la uva evitó las interferencias externas debidas al cobre en la ruta de síntesis de los precursores tiólicos. Curiosamente, la disminución de GSH se evitó notablemente mediante la adición de anhídrido sulfuroso en el mosto, lo que sugiere que se evitaron las interacciones químicas y enzimáticas que involucran el GSH y que la formación de un aducto de sulfito de GSH puede

evitar cualquier adición nucleofílica (Jastremski et al., 2017). ) (Tabla 1). En cualquier caso, las pérdidas de precursores tiólicos no pueden explicarse por su conversión a precursores de dipéptidos (Thibon et al., 2018), ya que no se detectaron GluCys-3SH y CysGly-3SH.

Condizioni estrazione mosto	Condizione esposizione e all'aria	G-3SHal ( $\mu\text{g/L}$ )	G-3SH ( $\mu\text{g/L}$ )	Cys-3SH ( $\mu\text{g/L}$ )	Cys (mg/L)	GSH (mg/L)	GRP (mg/L)
Nessuna aggiunta/trattamento	Oxic	1780 $\pm$ 1717 <sup>a</sup>	95.0 $\pm$ 20.2 <sup>a</sup>	126.6 $\pm$ 64.1 <sup>a</sup>	trace	trace	2.23 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
	Anoxic	341.8 $\pm$ 206.2 <sup>c</sup>	86.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	79.3 $\pm$ 10.9 <sup>b</sup>	trace	nd	2.72 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>
Aggiunta di fluoruro di sodio e EDTA	Oxic	14573 $\pm$ 881 <sup>b</sup>	110.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	94.3 $\pm$ 6.8 <sup>ac</sup>	trace	2.56 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
	Anoxic	9456 $\pm$ 575 <sup>d</sup>	84.6 $\pm$ 28.2 <sup>a</sup>	66.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	trace	1.23 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.83 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>
Lavaggio delle bucce degli acini	Oxic	339.9 $\pm$ 69.1 <sup>c</sup>	163.5 $\pm$ 15.8 <sup>b</sup>	101.3 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>	nd	nd	3.43 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>
	Anoxic	3146 $\pm$ 702 <sup>e</sup>	151.0 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>	146.1 $\pm$ 30.9 <sup>c</sup>	nd	nd	3.75 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>
Aggiunta di anidride solforosa	Oxic	16.19 $\pm$ 16.43 <sup>f</sup>	106.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	83.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	26.35 $\pm$ 5.12 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
	Anoxic	trace	107.0 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	83.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	32.81 $\pm$ 3.12 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>

Tabla 1: Concentraciones de S-3-(hexano-1-ol)-L-cisteína (Cys-3SH), S-3-(hexano-1-ol)-L-glutatión (G-3SH), S-3-(hexanal)-glutatión (G-3SHal), cisteína (Cys), glutatión (GSH) y Grape Reaction Product (GRP) en mostos elaborados en laboratorio.

Letras diferentes significan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## Conclusiones y perspectivas futuras

Este estudio destaca la importancia de las fases prefermentativas en el contenido de precursores tiólicos. En particular, la presencia de anhídrido sulfuroso e iones de cobre limitó la formación de G-3SHal disponible para su reducción a G-3SH. Las condiciones de exposición al aire pueden favorecer la formación de precursores de tioles, y esto podrá deberse a una mayor síntesis de (E)-2-hexenal. También se puede descartar la pérdida oxidativa. La clarificación fue responsable de una mayor disminución en condiciones de exposición al aire, probablemente debido a la adsorción sobre las partes sólidas favorecida por la presencia de oxígeno. En condiciones industriales (de bodega) es necesario prestar especial atención al prensado de las uvas para limitar la pérdida de precursores de tioles. La correcta gestión del contacto del mosto con el aire, la adición de anhídrido sulfuroso, las condiciones de extracción del mosto y el tiempo de contacto entre el mosto y las partes sólidas pueden permitir conservar los principales niveles de precursores de tioles y proteger las características aromáticas generales del vino.

La actual investigación en curso sobre este tema se est  realizando con uvas Trebbiano di Lugana y está centrada en las actividades enzimáticas involucradas en la formación y degradación de precursores de tioles.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la bodega Conti Tasca d'Almerita, Vallelunga Pratameno, Italia, por proporcionar muestras de uva y mosto y a Andrea Servetti por su apoyo t cnico.

## Referencias

- Ahmed, A. (2014). Synthesis and structural analysis of copper (II) glutathione complexes via Cu-S linkage. *World Applied Sciences Journal*, 29, 1357-1362.
- Allen, T., Herbst-Johnstone, M., Girault, M., Butler, P., Logan, G., Jouanneau, S., Nicolau, L., Kilmartin, P. A. (2011). Influence of grape-harvesting steps on varietal thiol aromas in Sauvignon blanc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 10641–10650.
- Bekker, M. Z., Day, M. P., Smith, P. A. (2019). Changes in metal ion concentrations in a Chardonnay wine related to oxygen exposure during vinification. *Molecules* 2019, 24, 1523.

- Chen, L., Capone, D. L., Nicholson, E. L., Jeffery, D. W. (2019). Investigation of intraregional variation, grape amino acids, and pre-fermentation freezing on varietal thiols and their precursors for *Vitis vinifera* Sauvignon blanc. *Food Chemistry*, 295, 637-645.
- Chen, L., Capone, D. L., Tondini, F. A., Jeffery D. W. (2018). Chiral polyfunctional thiols and their conjugated precursors upon winemaking with five *Vitis vinifera* Sauvignon blanc clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 4674-4682.
- Clark, A. C., Deed, R. C. (2018). The chemical reaction of glutathione and trans-2-hexenal in grape juice media to form wine aroma precursors: The impact of pH, temperature, and sulfur dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 1214-1221.
- Coetzee, C., du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*, 45, 287-298.
- Compendium of international methods of analysis - OIV. Method OIV-MA-F-AS322-06-CUIVRE for copper determination Resolution Oeno 2010, 56.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J., Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic compound of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10, 385-392.
- Fracassetti D., Vigentini I. (2018). Occurrence and analysis of sulfur compounds in wine. In A. M. Jordão, & F. Cosme (Eds.), *Grapes and wines-advances in production, processing, analysis and valorization* (pp. 225-251). Rijeka:InTechOpen.
- Fracassetti, D., Stuknytė, M., La Rosa, C., Gabrielli, M., De Noni, I., Tirelli A. (2018). Thiol precursors in Catarratto Bianco Comune and Grillo grapes and release of varietal thiols in wine under different clarification conditions of the must. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 24, 125-133.
- Fracassetti, D., Tirelli A. (2015). Monitoring of glutathione concentration during winemaking by a reliable high-performance liquid chromatography analytical method. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 389-395.
- Harsch, M. J., Benkowitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 3703–3713.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Matsui, K. (1995). The biogenesis of green odour by green leaves and its physiological functions - past, present and future. *Zeitschrift für Naturforschung* 50c, 467–472.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M., Nicolas, J. J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 926-931.
- Jastremski, J. A., Allison, R. B., Friedberg, E., Sacks, G. L. (2017) Role of elemental sulfur in forming latent precursors of H<sub>2</sub>S in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 10542-10549.
- Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C., Compton, R. G. (2016). The copper(II)-catalyzed oxidation of glutathione. *Chemistry A European Journal*, 22, 15937-15944.
- Pinu, F. R., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the volatile thiol 3-mercaptohexanol in Sauvignon blanc wines: no correlation with juice precursors. *American Journal of Enology and Viticulture* 63, 407–412.
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., Razungles A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry*, 125, 139-144.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., Schneider, R. (2010). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4406–4413.
- Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascués, E., Calderón, F., Benito, A., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S. (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 7425-7450.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., Baumesb, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta* 563, 58–64.
- Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexenal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, 199, 711-719.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry R., Dubourdieu, D. (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 159-162.